

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE QUITO**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN**

**BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN QUÍMICO-BIOLÓGICA DE UNA**

**SOLUCIÓN MODELO DE CAFEÍNA**

**AUTOR:**

**NICOLÁS ALEJANDRO GRIJALVA BORJA**

**DIRECTORA:**

**GABRIELA INÉS MENDEZ SILVA**

**Quito, agosto de 2020**

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Nicolás Alejandro Grijalva Borja, con documento de identificación N° 1718061144, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de grado/titulación intitulado: “Evaluación de la degradación químico – biológica de una solución modelo de cafeína”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nicolás Alejandro Grijalva-Borja

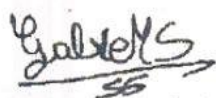
1718061144

18 de agosto de 2020

### **Declaratoria de coautoría de la docente tutora**

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:  
“Degradación químico – biológica de una solución modelo de cafeína” realizado por Nicolás  
Alejandro Grijalva Borja, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos  
estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final  
de titulación.

Quito, agosto de 2020.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gabriela Inés Méndez Silva', with a horizontal line underneath and a small mark below the line.

Gabriela Inés Méndez Silva

1722305057

### **Dedicatoria**

Este trabajo lo dedico a Martina, quien aparte de ser mi más grande reto, es mi mayor inspiración. Hija, nunca olvides que todo esfuerzo tiene recompensa, que todo sueño puede ser cumplido y que lo único que no podrás lograr es lo que no hagas. Siempre estaré contigo.

## **Agradecimientos**

Siendo este trabajo el resultado de cinco años de estudio, agradezco a mi familia: Connie, por tu apoyo incondicional y desinteresado, por tu paciencia y amor. Zoila, por su cariño y su cuidado, por sus consejos y amor. Vicky, por tu apoyo incondicional, por siempre creer en mí aun cuando parecía que no iba a valer la pena, por tu inmenso amor, por siempre estar para mí. A Rafael y Concepción, por su apoyo, consejos, cariño y amor, siempre estaré muy agradecido de tenerlos en mi vida. Al resto de mi familia, porque cada uno, de una u otra manera ha contribuido para que pueda culminar esta etapa.

Agradezco también a mis profesores y profesoras: Leadina, por tu motivación y apoyo incondicional, por creer en mí desde el principio y por haber sido no sólo mi profesora, si no también mi amiga. A Gabriela, por su apoyo y paciencia, por su valioso aporte para la consecución de este trabajo. A Sabino, por su apoyo, sus conocimientos y, sobre todo, por haber sido mi inspiración. A todos los demás con quien tuve el gusto de compartir clases, siempre los llevaré en mi corazón.

A mis amigos, Christopher, Sebastián y Juan por haberme acompañado en los momentos más alegres y también en los más tristes de mi vida universitaria y personal, por su apoyo, su cariño y amistad sincera; sin ustedes, no lo hubiera logrado. También a Doris y Marcela, gracias por todo.

Por último, agradezco a la universidad por haberme dado los años más maravillosos de mi vida, por haberme hecho crecer y a ser una persona de bien. Por haberme enseñado a amar y respetar al prójimo y, lo más importante, por haberme permitido servir, haciendo de ese mi principal valor. A José, Irene, Karen, Jessica quienes de una u otra forma siempre estuvieron para mí, nunca me olvidaré de ustedes.

## Índice

Introducción. ....	1
Capítulo I.....	5
1 Marco conceptual. ....	5
1.1 Contaminantes emergentes. ....	5
1.2 La cafeína .....	8
1.2.1 Compuestos relacionados con la cafeína.....	9
1.2.2 Efectos de la cafeína en el ser humano. ....	10
1.3 Procesos avanzados de oxidación.....	12
1.3.1 Fotocatálisis heterogénea. ....	12
1.4 Degradación biológica de contaminantes. ....	14
1.4.1 Mecanismos de degradación biológica de la cafeína. ....	15
1.4.2 Microorganismos degradadores de cafeína .....	16
1.5 Degradación químico – biológica de contaminantes (procesos en secuencia).....	17
Capítulo II .....	22
2 Marco metodológico .....	22
2.1 Localización: .....	22
2.2 Selección de las mejores condiciones químicas para llevar a cabo la degradación fotocatalítica. ....	22
2.3 Desarrollo de ensayos fotoquímicos – microbiológicos secuenciales para degradar la solución modelo de cafeína. ....	24
2.3.1 Aislamiento y aclimatación de microorganismos degradadores de cafeína.....	24

2.3.2	Identificación de los microorganismos aislados.....	25
2.3.3	Ensayo de degradación biológica por lotes .....	26
2.3.4	Degradación químico – biológica secuencial:.....	27
2.4	Evaluación del efecto sinérgico entre la degradación fotocatalítica y la degradación microbiológica de la cafeína. ....	27
Capítulo III.....		29
3	Resultados y discusión. ....	29
3.1	Selección de las mejores condiciones químicas para llevar a cabo la degradación fotocatalítica. ....	29
3.2	Desarrollo de ensayos fotoquímicos – microbiológicos secuenciales para degradar la solución modelo de cafeína. ....	36
3.2.1	Aislamiento y mantenimiento de microorganismos degradadores de cafeína. ..	36
3.2.2	Ensayo de degradación biológica por lotes .....	38
3.3	Evaluación del efecto sinérgico entre la degradación fotocatalítica y la degradación microbiológica de la cafeína .....	41
Conclusiones .....		47
Recomendaciones.....		48
Referencias.....		49
4	Anexos.....	61

## Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de contaminantes emergentes encontrados. ....	6
Tabla 2. Presencia de cafeína reportada en cuencas hidrográficas del Ecuador. ....	7
Tabla 3. Contenido de cafeína de diferentes bebidas y comidas.....	8
Tabla 4. Conclusiones de diversos estudios relacionados con los efectos negativos de la cafeína en el ser humano.....	11
Tabla 5. Comparación de las tasas de degradación de varios microorganismos.....	16
Tabla 6. Ventajas de los tratamientos químico-biológicos combinados con diversos contaminantes.....	19
Tabla 7. Diseño experimental de la degradación fotoquímica. ....	22
Tabla 8. Escala McFarland.....	26
Tabla 9. Resultados de la fotocatálisis heterogénea (degradación fotoquímica). ....	30
Tabla 10. Resumen de los resultados de degradación química y biológica por separado.....	42



## Índice de figuras

Figura 1. (izq.) Estructura química de la cafeína. (der.) Planta de <i>C. arabica</i> .....	9
Figura 2. Estructura de la cafeína y otros compuestos relacionados.....	10
Figura 3. Procesos que ocurren en la interfaz semiconductor-electrolito bajo iluminación.. ..	13
Figura 4. Representación esquemática de la N-desmetilación de la cafeína por (A) oxidación y (B) hidrólisis.....	16
Figura 5. Fotoreactor Techinstro® utilizado para los ensayos de degradación fotocatalítica.	23
Figura 6. Curva de calibración de la cafeína .....	29
Figura 7. Curva de degradación fotoquímica de cafeína, condición 1 a 1 .....	31
Figura 8. Curva de degradación fotoquímica de cafeína, condiciones 2 a 1.....	32
Figura 9. Influencia del pH en la degradación fotoquímica de la cafeína. Barras con una letra común no mantienen diferencia significativa a $p > 0,05$ .....	33
Figura 10. Influencia de la condición experimental (relación de fotocatalizador/ $H_2O_2$ ) en la degradación fotoquímica de cafeína. Barras con una letra común no mantienen diferencia significativa a $p > 0,05$ . .....	34
Figura 11. Interrelación entre todas las variables estudiadas. Barras con una letra común no mantienen diferencia significativa a $p > 0,05$ . .....	35
Figura 12. Microorganismos aislados en medios de cultivo CAM (Caffeine Agar Medium) de muestras de tierra con cultivos de café. (izq.) Vertido en placa (der.) Aislamiento. ....	36
Figura 13. Tinción gran de los microorganismos aislados. (izq.). Bacilos gramnegativos cortos. (der.) Bacilos gramnegativos alargados. ....	37
Figura 14. Curva de crecimiento de los microorganismos.....	38
Figura 15. Curva de degradación normalizada del ensayo de degradación biológica por lotes .....	39

Figura 16. Curva del porcentaje de degradación del ensayo de degradación biológica por lotes. .....	40
Figura 17. Gráfico de los resultados de degradación química y biológica por separado .....	42
Figura 18. Curva de degradación de los ensayos combinados. ....	44
Figura 19. Fotoproductos derivados de la fotocatálisis de cafeína. La estructura central ( $m/z = 194$ ) pertenece a la cafeína .....	45

## Resumen

El presente trabajo se basó en la evaluación de la degradación químico – biológica de una solución modelo de cafeína (50 ppm), para ello se planteó primero realizar una degradación química a través de fotocatálisis de cafeína con  $\text{TiO}_2$  como fotocatalizador, luego se realizó un ensayo de degradación biológica, para ello se aisló, aclimató y utilizó una cepa de bacterias degradadoras de cafeína obtenidas de un cultivo de café y por último se realizó un ensayo combinado en secuencia. Se obtuvo, en la parte química, una degradación máxima de  $88 \pm 2$  %, después de tres horas de exposición a un  $\text{pH} = 4$  y con la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en relación 2 a 1 con el fotocatalizador. Para la degradación biológica, se obtuvo una máxima degradación de  $87 \pm 2$  %, después de 48 horas de degradación a 150 rpm y  $35^\circ\text{C}$ . Las bacterias utilizadas fueron *Pseudomonas* sp identificadas a través de su morfología y pruebas bioquímicas. En cuanto a la degradación combinada, se obtuvo porcentaje de degradación del de  $99 \pm 1$  % que no se puede atribuir a la degradación secuencial, debido a que en la solución control se observó la misma degradación luego del tiempo de estudio (24 horas), esto puede ser por la presencia de productos fototóxicos en la solución.

**Palabras clave:** Contaminantes emergentes, cafeína, degradación biológica, fotocatálisis.

## Abstract

The present work was based on the evaluation of the chemical-biological degradation of a caffeine model solution (50 ppm), for this, it was first proposed to carry out a chemical degradation through caffeine photocatalysis with  $\text{TiO}_2$  as a photocatalyst, then a biological degradation test was carried out, for this a strain of caffeine-degrading bacteria obtained from a coffee crop and finally a combined trial was performed in sequence. In the chemical part, a maximum degradation of  $88 \pm 2 \%$  was obtained, after three hours of exposure to a  $\text{pH} = 4$  and with the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a 2 to 1 ratio with the photocatalyst. For the biological degradation, a maximum degradation of  $87 \pm 2 \%$  was obtained, after 48 hours of degradation at 150 rpm and  $35^\circ\text{C}$ . The bacteria used were *Pseudomonas* sp identified through their morphology and biochemical tests. Regarding the combined degradation, a degradation percentage of  $99 \pm 1 \%$  was obtained, but cannot be attributed to sequential degradation because the same degradation is triggered in the control solution after the study time (24 hours), this may be due to the presence of phototoxic products in the solution.

**Keywords:** Emerging pollutants, caffeine, biological degradation, photocatalysis.

## **Introducción**

En el año 2014, las sustancias químicas, orgánicas e inorgánicas, sumaban 88,3 millones sin embargo, menos del 0,05 % de estas se encuentran normadas a nivel mundial (Ramírez-Sánchez, Martínez-Austria, Quiroz-Alfaro, & Bandala, 2015). Las sustancias que no se encuentran normadas y que pueden causar daño a los seres vivos aún en muy bajas concentraciones se las denomina “Contaminantes Emergentes”, es así que los contaminantes emergentes pueden entenderse en un sentido amplio como un compuesto, químico con efectos ecológicos y para la salud humana tóxicos, conocidos y que se encuentren en baja concentración en el medio ambiente (UNESCO, 2019). Estos contaminantes incluyen principalmente sustancias químicas en productos farmacéuticos, artículos para el cuidado personal, pesticidas, productos industriales y para el hogar, metales, surfactantes, aditivos industriales y disolventes. Muchos de ellos se utilizan y se liberan en el medio ambiente. Algunos pueden causar toxicidad en diferentes organismos: seres humanos, vida silvestre o incluso promueven resistencias en microorganismos patógenos (Ramírez-Sánchez et al., 2015; UNESCO, 2019).

La cafeína está clasificada como un contaminante emergente y es uno de los alcaloides más usados a nivel mundial, en bebidas preparadas como café o té, en productos de consumo personal como cremas o lociones, y en fármacos (Marques et al., 2013; Schuh & Griffiths, 1997). La cafeína tiene una alta solubilidad en agua (10 g/L) (Elhalil et al., 2018), lo cual hace que sea tan fácil su inserción en cualquier cuerpo de agua. De igual manera, la presencia de cafeína en agua puede producir efectos negativos en los organismos que la habitan y en el ambiente ecológico; en dosis moderadas (superiores a 680 mg/L) puede reducir la coordinación motora fina, causa insomnio, dolores de cabeza, nerviosismo, entre otros (Elhalil et al., 2018; Gummadi, Ganesh, & Santhosh, 2009; Marques et al., 2013).

En el Ecuador, los contaminantes emergentes se encuentran presentes en las cuencas hidrográficas más importantes del país en las cuales se ha reportado la abundante presencia de cafeína. Por ejemplo, en la cuenca del Machángara se han reportado valores de 5597.0 µg/L (Voloshenko-Rossin et al., 2015a). A pesar de que la cafeína presenta una baja ecotoxicidad, aun en tan bajas concentraciones es muy perjudicial para la fertilidad de la vida acuática del sector (Voloshenko-Rossin et al., 2015b).

Por otra parte, en las últimas dos décadas, los Procesos Avanzados de Oxidación (AOP) han causado un gran impacto sobre los científicos debido a su potencial en la remediación ambiental (Moreira et al., 2018; Robert, Keller, & Selli, 2017). La fotocatálisis es un AOP que, en términos generales, se trata de una reacción que ocurre en presencia de un catalizador, el cual acelera dicha reacción. Empezó a generar interés desde que en 1972 se descubrió la hidrólisis electroquímica fotoasistida del agua con un microcristal de TiO<sub>2</sub> y desde dicha fecha se han incrementado exponencialmente las investigaciones en este tema (Rodriguez-Narvaez, Peralta-Hernandez, Goonetilleke, & Bandala, 2017). El TiO<sub>2</sub> fotoexitado ha sido utilizado para diferentes aplicaciones, tales como en superficies antivaho y autolimpiantes hasta aplicaciones no tan comunes como en impresiones offset (Cruz, 2015).

En la actualidad, ciertos estudios se han centrado en explotar aún más el potencial que brinda la fotocatálisis, aprovechando la radiación en el rango del espectro electromagnético relacionado con la luz visible (Arlos et al., 2016; Moreira et al., 2018; Wang, He, Chen, & Wang, 2019) y así poder disminuir costos asociados a las fuentes de radiación del catalizador. De igual manera, se ha estudiado las aplicaciones ambientales que esta técnica ha desarrollado a lo largo de los últimos años, tanto en suelos, cuerpos de agua y gases (Lin et al., 2013). Diversos estudios han utilizado la fotocatálisis en la eliminación de contaminantes emergentes (Bolong, Ismail, Salim, & Matsuura, 2009; Ghernaout & Elboughdiri, 2019; Robert et al., 2017; Sornalingam, McDonagh, Zhou, Johir, & Ahmed, 2018), específicamente en cafeína, se han

reportado porcentajes de degradación de 71 a 96 % (Marques et al., 2013), de 89 a 92 % (Elhalil et al., 2018) y de 90 % (Almeida, Lenzi, Pietrobelli, & Onélia, 2019). La eficiencia de esta reacción en la degradación de contaminantes emergentes de aguas residuales es ampliamente reconocida (Bolong et al., 2009; Ghernaout & Elboughdiri, 2019; Waghmode et al., 2019).

Se considera importante también complementar los ensayos químicos de degradación de contaminantes con ensayos biológicos. La degradación biológica de una sustancia química se trata de la supresión de dicha sustancia a través del uso mayoritario de microorganismos que viven en el medio del contaminante (Oller, Malato, & Sánchez-Pérez, 2011). En este sentido, los procesos de degradación biológica proporcionan resultados poco satisfactorios, en comparación con los AOPs ya que muchas sustancias son resistentes a este tratamiento. Por esta razón se plantea como alternativa la aplicación de tratamientos combinados químicos y biológicos, como el uso de AOPs, muy reconocidos para la eliminación de contaminantes (Abd Kadir, Yaakob, & Mohamed Zulkifli, 2013; Oller et al., 2011) y tratamientos biológicos con microorganismos (bacterias) para obtener mejores resultados. En trabajos citados anteriormente (Cédat, de Brauer, Métivier, Dumont, & Tutundjan, 2016; A Espejo, Aguinaco, García-Araya, & Beltrán, 2014; Khan, Yu, Achari, & Tay, 2019; Khenniche et al., 2015; Nivya & Pieus, 2016; Sun, Chen, Chen, Wang, & Zhang, 2016; Tatoba R. Waghmode et al., 2019; Xu, Siracusa, Gregorio, & Yuan, 2018) la aplicación de técnicas combinadas ha sido reportada como un tratamiento eficiente en cuanto a el aumento de la biodegradabilidad del contaminante, la disminución del tiempo de reacción, aumento de la eficacia entre otros; por ejemplo Waghmode et al. (2019) reportan un estudio realizado con consorcios bacterianos en el cual utilizaron fotocátalisis heterogénea para degradar rojo metilo, en donde el tratamiento químico independiente reporta un 70 % de degradación y el tratamiento biológico independiente reporta un 100 % en 6 horas. El tratamiento combinado reportó un 100 % en 4 horas, disminuyendo el tiempo de reacción.

El presente trabajo se enfoca en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) número 6: agua limpia y saneamiento, número 11: ciudades y comunidades sostenibles y número 14: vida submarina.

Con base en lo explicado anteriormente, la pregunta de investigación es: ¿Qué tan efectiva es la aplicación de técnicas fotoquímicas y biológicas en secuencia en la degradación de cafeína en comparación con los tratamientos de degradación por separado?

El objetivo del presente trabajo es: Evaluar la degradación químico - biológica de una solución modelo de cafeína; para llevarlo a cabo, se plantean los siguientes objetivos específicos: i) Seleccionar las mejores condiciones químicas para llevar a cabo la degradación fotocatalítica ii) Desarrollar ensayos fotoquímicos – microbiológicos en secuencia para degradar la solución modelo de cafeína y iii) Evaluar el efecto sinérgico entre la degradación fotocatalítica y la degradación microbiológica de la cafeína. Siendo la hipótesis planteada: con la aplicación de un tratamiento fotoquímico y biológico de manera secuencial se obtendrá una mayor degradación de cafeína que en los procesos de degradación por separado.



## Capítulo I

### 1 Marco conceptual.

#### 1.1 Contaminantes emergentes.

Los contaminantes emergentes pueden entenderse en un sentido amplio como un compuesto químico, natural o sintético, con efectos ecológicos y para la salud humana tóxicos y que se encuentren en baja concentración en el medio ambiente (UNESCO, 2019). Se ha definido una amplia gama de sustancias químicas que no se monitorean en las plantas de tratamiento de aguas (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2012). Estos contaminantes incluyen principalmente compuestos químicos encontrados en artículos farmacéuticos o para el cuidado personal, pesticidas, productos industriales y para el hogar, metales, surfactantes, aditivos industriales y solventes. Muchos de ellos se utilizan y se liberan en el medio ambiente en pequeñas cantidades; causan diferentes efectos negativos en la salud humana y en la vida silvestre del lugar (Ramírez-Sánchez et al., 2015; UNESCO, 2019). Estos contaminantes no requieren mantener una presencia continua en el ambiente para causar daño a los organismos, la gran variabilidad que poseen compensa su introducción continua en el medio ambiente (Barceló & López, 2007).

En la *Error! Reference source not found.* se resumen los principales tipos de contaminantes emergentes.

Tabla 1.

Tipos de contaminantes emergentes reportados.

<b>Contaminante emergente</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplos de contaminantes</b>	<b>Referencia</b>
Pesticidas y plaguicidas	Los pesticidas son sustancias o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar las plagas. Causan preocupación por los productos de degradación y pueden llegar a ser más tóxicos que los compuestos a partir de los que se generan.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etilentiourea</li> <li>• Alcohol cloroalílico</li> <li>• Isotiocianato de metilo</li> </ul>	Geerdink, Niessen, & Brinkman, 2002; Gil et al., 2012.
Productos farmacéuticos.	Las vías principales de ingreso de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados y por el uso agrícola. Se consideran como contaminantes pseudo persistentes, que entran continuamente en el ambiente en concentraciones muy bajas. Hasta ahora, se ha detectado más de 160 productos farmacéuticos diferentes en sistemas acuáticos en concentraciones muy bajas de ng/L a un rango bajo de µg/L.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cafeína</li> <li>• Diclofenaco</li> <li>• Carbamazepina</li> </ul>	Gogoi et al., 2018; Poynton & Vulpe, 2009.

<b>Contaminante emergente</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplos de contaminantes</b>	<b>Referencia</b>
Drogas ilícitas	Los efectos de las drogas en el medio acuático son desconocidos. Las drogas ilícitas ingresan en cuerpos de agua por medio de plantas de tratamiento de aguas residuales; tanto las drogas ilícitas como sus metabolitos, son muy recalcitrantes a la eliminación de tratamientos convencionales físicoquímicos y biológicos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Codeína</li> <li>• Cocaína</li> <li>• Metadona</li> </ul>	Cosenza et al., 2018; Peña-Guzmán et al., 2019.
Disruptores endócrinos	Estructuras similares a las hormonas naturales, causando una participación negativa en el sistema endocrino de humanos y animales.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estrona</li> <li>• Estradiol</li> </ul>	Peña-Guzmán et al., 2019; Vilela, Bassin, & Peixoto, 2018.

Elaborado por: El autor, 2020

En el Ecuador, los contaminantes emergentes se encuentran presentes en las cuencas hidrográficas más importantes del país en las cuales se ha reportado la abundante presencia de cafeína (Voloshenko-Rossin et al., 2015b). En la tabla se observan los valores reportados de cafeína en cuencas hidrográficas del Ecuador.

Tabla 2.

Presencia de cafeína reportada en cuencas hidrográficas del Ecuador.

<b>Cuenca Hidrográfica</b>	<b>Cantidad en µg/L</b>
Machángara N	5597,0
Cumbayá San Pedro	87,0

Monjas	550,0
Guayllabamba (puente)	752,0
Las Golondrinas	17,5

Fuente: adaptado de Voloshenko-Rossin et al. (2015).

## 1.2 La cafeína

Químicamente, la cafeína es una metilxantina polar. En estado puro, la cafeína es un polvo blanco inodoro, amorfo, intensamente amargo con una masa molar de 194.19 g/mol (Kwaśniewska-Sip, Cofta, & Nowak, 2018).

La cafeína (3,7-dihidro-1,3,7-trimethyl-1 H-purina-2,6 diona) es uno de los alcaloides más usados alrededor del mundo, en una variedad de productos como bebidas energéticas, café, té, fármacos, choclales, entre otros (S. Dash & Gummadi, 2013). En la *Tabla 3* se detallan las bebidas y comidas junto con su contenido en cafeína.

Tabla 3.

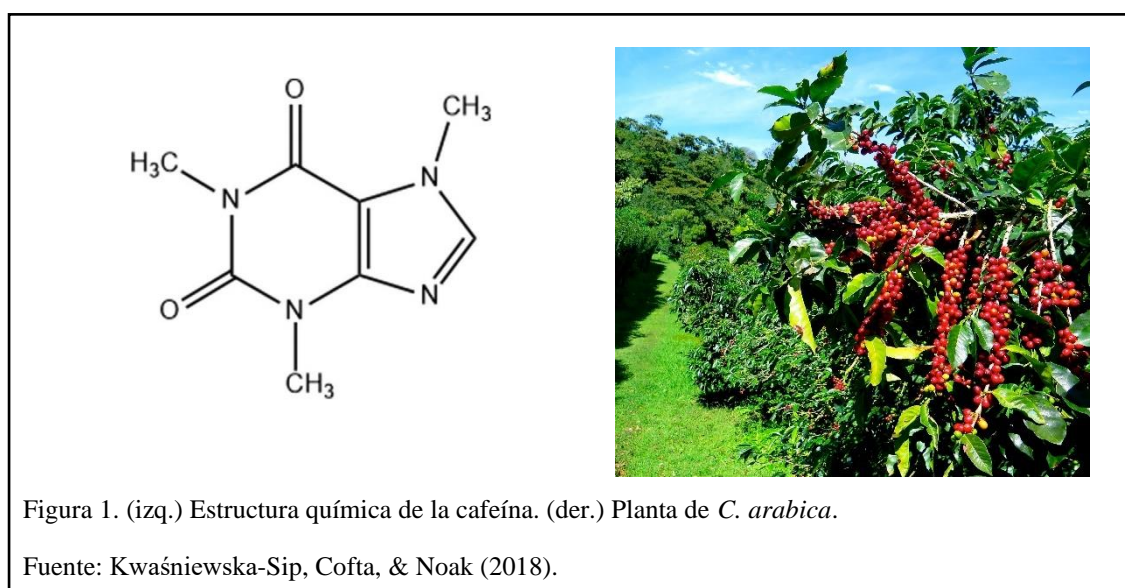
Contenido de cafeína de diferentes bebidas y comidas.

Bebidas y comidas	Contenido de cafeína
Café (filtrado)	130 – 680 mg/L
Café (instantáneo)	130 – 400 mg/L
Café (descafeinado)	13 – 20 mg/L
Expreso	3400 mg/L
Té negro	100 – 470 mg/L
Té helado (embotellado)	70 – 100 mg/L
Refresco (descafeinado)	100 – 270 mg/L
Pastillas con cafeína	100 mg/pastilla

Bebidas y comidas	Contenido de cafeína
Chocolate amargo	875 mg/kg

Fuente: Adaptado de Dash & Gummadi (2013).

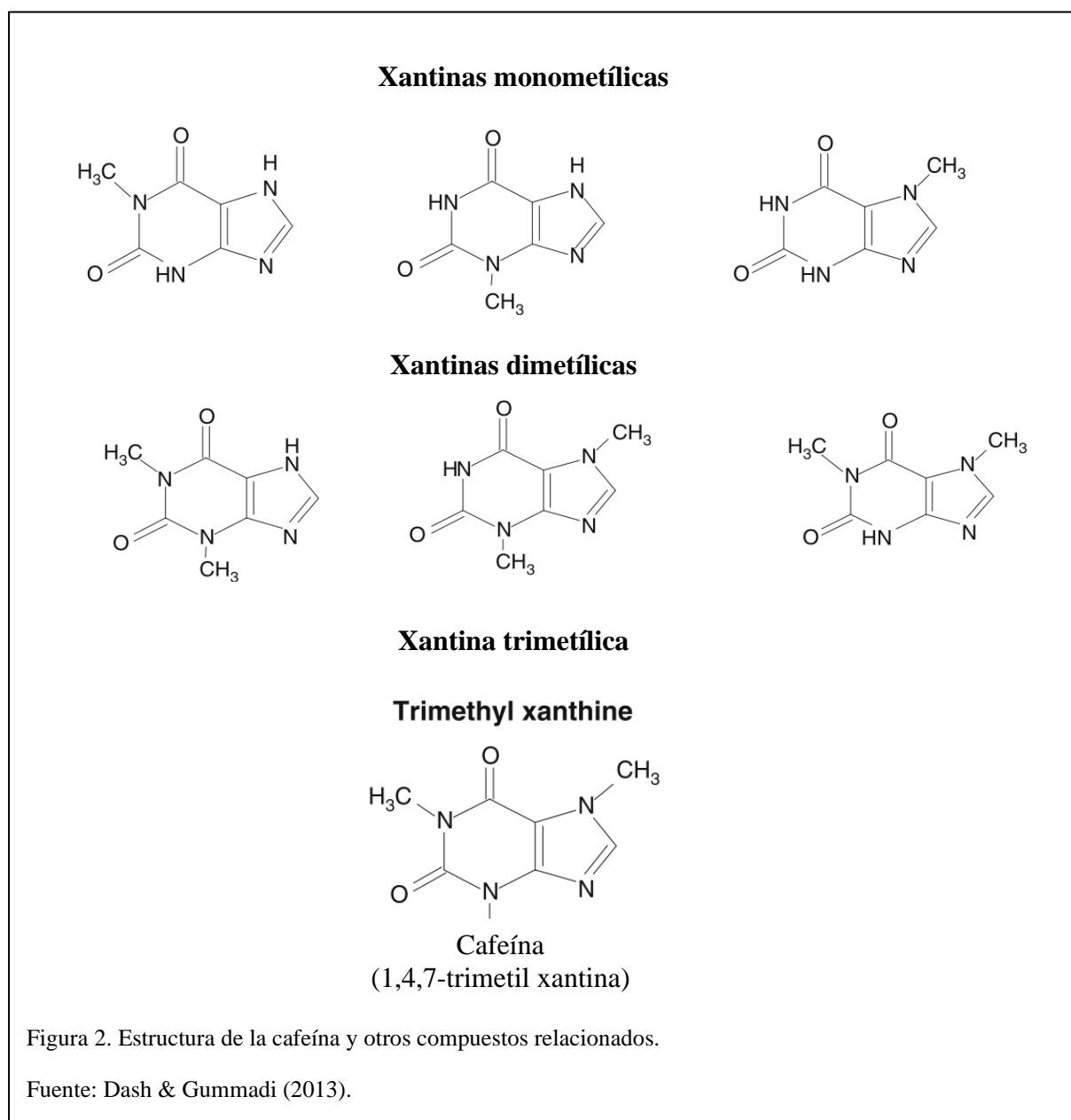
En la naturaleza, la cafeína se obtiene de las hojas y frutos de 13 diferentes plantas, entre las que se incluyen el café (*Coffea arabica*), el té (*Camellia sinensis*), el mate (*Ilex paraguariensis*), guaraná (*Paullinia coplanar*), cola (*Cola nítida*) y el cacao (*Theobroma cacao*) (Ashihara & Crozier, 2001; S. Dash & Gummadi, 2013). La principal fuente de cafeína es la semilla de la planta de café (*C. arabica*), cuyo contenido de cafeína es entre el 1 y el 4 % en peso seco (DePaula & Farah, 2019).



### 1.2.1 Compuestos relacionados con la cafeína

Además de la cafeína, otras metilxantinas también forman un grupo importante de compuestos con la estructura básica de purina. La mayoría de las metilxantinas son los intermediarios de la vía de degradación de la cafeína en diversas formas de vida, resultantes de la desmetilación de dicha sustancia. Estos incluyen dimetilxantinas, concretamente teobromina (3,7-dimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina) y paraxantina (1,7-dimetilxantina);

monometilxantinas como 7-metilxantina, 3-metilxantina y 1-metilxantina; y xantina (Dash & Gummadi, 2013), las estructuras de los compuestos señalados se muestran en la *Figura 2*.



### 1.2.2 Efectos de la cafeína en el ser humano.

Se han reportado diversos efectos adversos de la cafeína en el ser humano, como por ejemplo en el humor, el comportamiento, el sueño, en el sistema cardiovascular, en el metabolismo de la glucosa, en el balance de calcio, en la fertilidad y la carcinogénesis, entre otros (DePaula & Farah, 2019; Lyngsø et al., 2017; Nurminen, Niittynen, Korpela, & Vapaatalo, 1999;

Silverman, Evans, Strain, & Griffiths, 1992; Vaseghi et al., 2018; Whitehead & White, 2013).

En la *Tabla 4*, se muestran los diversos efectos negativos y las conclusiones de diversos estudios realizados (DePaula & Farah, 2019).

Tabla 4.

Conclusiones de diversos estudios relacionados con los efectos negativos de la cafeína en el ser humano.

<b>Dosis de Café / Cafeína</b>	<b>Conclusiones</b>
<b>Ansiedad</b>	
480 mg de cafeína	Los pacientes con trastornos de pánico y trastornos de ansiedad social tuvieron un mayor número de ataques de pánico inducidos, algunos síntomas de ansiedad específicos y una respuesta de ansiedad más severa que los voluntarios sanos.
<b>Sistema cardiovascular</b>	
Dosis únicas de 200 – 250 mg de cafeína	Aumento de la presión arterial sistólica en 3–14 mmHg y presión arterial diastólica por 4–13 mmHg.
<b>Metabolismo de la glucosa</b>	
Entre 200 – 500 mg de cafeína	La ingesta de cafeína aumentó las concentraciones de glucosa en sangre en 16-28 % del área bajo la curva de cafeína
<b>Balance de calcio en los huesos</b>	
280 – 240 mg de cafeína / día	El consumo diario de 280–420 mg de cafeína puede acelerar la pérdida ósea de la columna vertebral en

<b>Dosis de Café / Cafeína</b>	<b>Conclusiones</b>
	mujeres con ingestas de cafeína / día de calcio por debajo de la cantidad diaria recomendada de 800 mg.
<b>Efectos en la fertilidad</b>	
>600 mg de cafeína al día	El consumo de café/cafeína está asociado con un incremento significativo en el riesgo de abortos espontáneos.
<b>Carcinogénesis</b>	
1 – 3 copas de café al día	El consumo de café con cafeína se asoció con el riesgo de carcinoma basocelular.

Fuente: modificado de Depaula & Farah (2019).

### **1.3 Procesos avanzados de oxidación.**

Los Procesos Avanzados de Oxidación (AOPs por sus siglas en inglés) se definen como los procesos de oxidación que involucran la generación de radicales hidroxilos ( $\text{OH}\bullet$ ) en cantidad suficiente para degradar diversas categorías de contaminantes. Permite la generación in situ de varias especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de diferentes procesos como sonólisis, ozonización, UV, procesos Fenton, etc. Estos ROS son los que posteriormente se utilizan para la degradación de los contaminantes (Mishra et al., 2017).

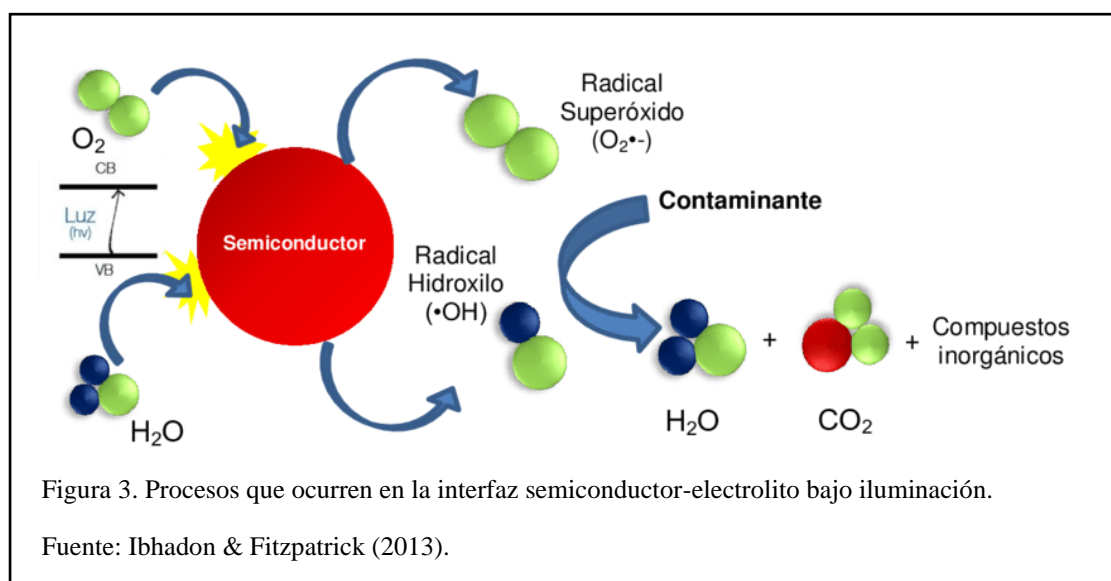
Los AOPs fueron propuestos por primera vez en los años 80 para el tratamiento de agua potable, luego también han sido utilizados para el tratamiento de aguas residuales debido a que los oxidantes fuertes pueden fácilmente degradar los contaminantes orgánicos recalcitrantes y eliminar ciertos contaminantes inorgánicos en aguas residuales (Deng & Zhao, 2015).

#### **1.3.1 Fotocatálisis heterogénea.**

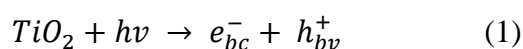
La fotocatálisis heterogénea es un Proceso de Oxidación Avanzada que se basa en el uso de radiación UV para foto-excitar un catalizador semiconductor en contacto con agua y en



presencia de oxígeno (Cruz, 2015). El catalizador más utilizado es el  $\text{TiO}_2$  debido a sus propiedades: no tóxico, resistente a la corrosión y biocompatible (Khudhair et al., 2016). En la región interfacial entre sólido excitado y la solución tienen lugar las reacciones de destrucción o de remoción de los contaminantes. En la *Figura* se detallan los procesos químicos que ocurren en una partícula del semiconductor cuando se encuentra excitada con luz suficientemente energética. Así se crean pares electrón-hueco que deben migrar a la superficie y reaccionar con especies adsorbidas (Lin et al., 2013). Los pares electrón-hueco que no logran separarse, al reaccionar con especies en la superficie se recombinan y la energía se disipa. Esta recombinación puede tener lugar tanto en la superficie como en el seno de la partícula. El proceso neto es la catálisis de la reacción entre un oxidante y un reductor (Lin et al., 2013).



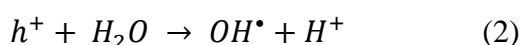
Mediante la absorción de un fotón de longitud de onda menor que la energía del *bandgap*, un electrón de la banda de valencia (BV) es promovido a la banda de conducción (BC), generándose un hueco en la primera (Hoffmann, Martin, Choi, & Bahnemann, 1995). La reacción química del proceso fotocatalítico se detalla en la ecuación 1:



Las especies fotogeneradas pueden participar en reacciones redox con diferentes especies químicas debido a que el hueco en la banda de valencia es fuertemente oxidante y el electrón

en la banda de conducción es moderadamente reductor (Domènech, Jardim, & Litterb, 2001; Ibhaddon & Fitzpatrick, 2013).

En los sistemas acuosos los constituyentes más importantes son el agua, el oxígeno molecular y otras especies disueltas, eventualmente contaminantes a ser removidos del sistema. Los huecos pueden reaccionar con las especies adsorbidas, pero normalmente son capturados por el agua o grupos  $\text{OH}^\bullet$  superficiales formando radicales hidroxilo, normalmente retenidos en la superficie del catalizador (Hoffmann et al., 1995). Esto se indica en las ecuaciones 2 y 3:



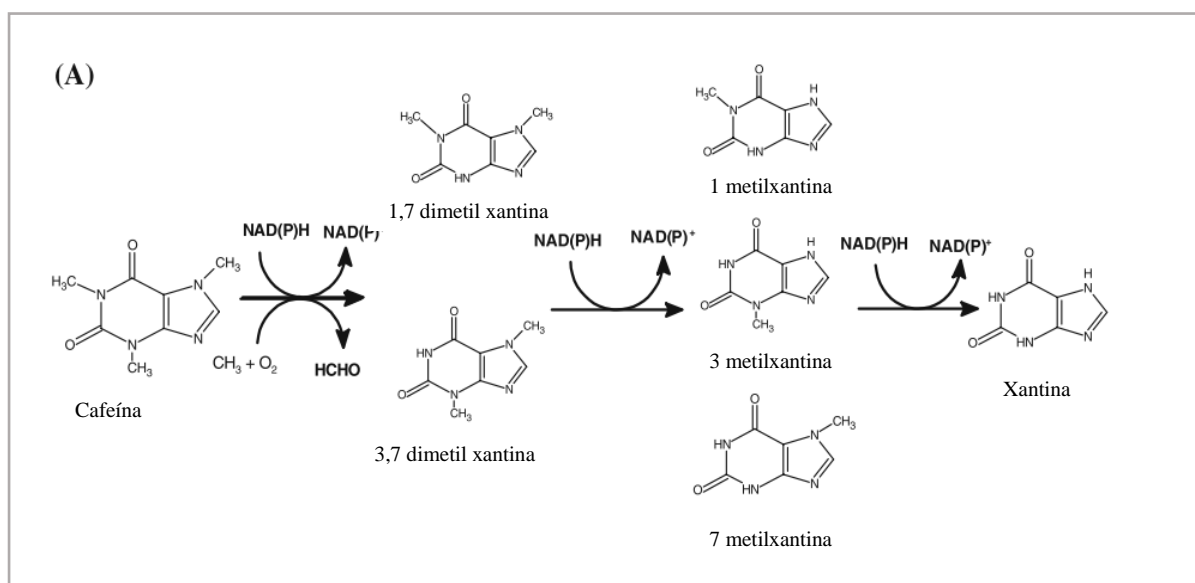
Dada la gran diferencia entre las energías de las bandas de valencia y de conducción (band gap, aproximadamente 3 eV) el  $\text{TiO}_2$  es activo sólo en luz UV. El espectro puede ampliarse “dopando” el semiconductor con iones metálicos o recubriéndolo con colorantes que absorben radiación de menor energía (Hodak, Quinteros, Litterb, & Roman, 1996). En este último caso, la absorción de radiación promueve a la molécula fotosensibilizadora a un estado excitado que es a la vez mejor donador y mejor aceptor de electrones que el estado fundamental (Ibhaddon & Fitzpatrick, 2013).

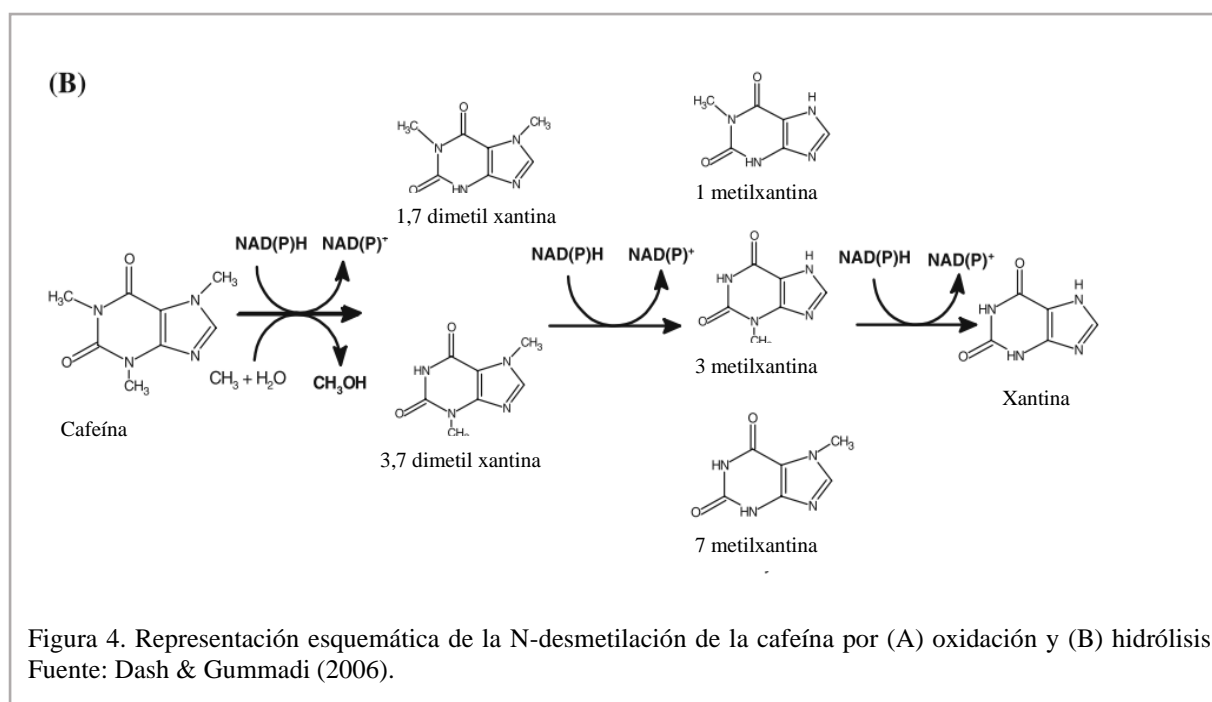
#### **1.4 Degradación biológica de contaminantes.**

Se entiende por degradación biológica el conjunto de procesos por los cuales los microorganismos utilizan como fuente de energía un contaminante, completando su metabolismo y degradando así el o los contaminantes de interés (Buckley, Bender, Stahl, Martinko, & Madigan, 2015). La habilidad de degradar cafeína ha sido reportada en diferentes especies de bacterias y hongos aislados de suelos con cultivos de café (Dash & Gummadi, 2006; Gokulakrishnan, Chandraraj, & Gummadi, 2005); las bacterias degradan la cafeína de dos formas: oxidación e hidrólisis (Dash & Gummadi, 2006) que se describen a continuación.

### 1.4.1 Mecanismos de degradación biológica de la cafeína.

La especulación de que la N-desmetilación era el posible mecanismo de conversión de cafeína a su derivado metilado provino del estudio de Woolfolk, 1975, que demostró la actividad degradante de la metilxantina en extractos libres de células y fracciones subcelulares de *Pseudomonas putida* (Woolfolk, 1975). Sugirió que la conversión de cafeína en sus metabolitos fue provocada por una enzima que eliminó hidrolíticamente los tres grupos metilo con la producción de metanol y xantina libre (Fig. 20.5a). La xantina libre presumiblemente entró en la vía de degradación de la purina para convertirse en compuestos más simples por la acción de enzimas como la xantina deshidrogenasa y la uricasa. El metanol formado se oxidó a CO<sub>2</sub> a través formaldehído por la acción secuencial de metanol deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa y formiato deshidrogenasa (Woolfolk, 1975). Blecher & Lingens (1977) confirmaron aún más la implicación de la enzima desmetilasa en la degradación de la cafeína en una cepa de *Pseudomonas putida*. Sin embargo, postularon que la desmetilación era oxidativa en lugar de hidrolítica, como sugiere Woolfolk, lo que resultó en la formación de formaldehído en lugar de metanol (*Figura* ).





#### 1.4.2 Microorganismos degradadores de cafeína

Se han reportado diversos microorganismos capaces de degradar cafeína, principalmente las bacterias del género *Pseudomonas* y *Serratia*; y hongos como *Aspergillus* (Dash & Gummadi, 2013; Gummadi & Santhosh, 2006). En la *Tabla 5* se muestra la comparación de la tasa de degradación de diferentes microorganismos.

Tabla 5.

Comparación de las tasas de degradación de varios microorganismos.

Microorganismo	Concentración inicial de cafeína (g/L)	Fuente de carbono (g/L)	% de degradación de cafeína	Tasa de degradación (g/L/h)
<i>Klebsiella</i> y <i>Rhodococcus</i>	0,5	Glucosa (1)	100% en 10 h	0,05
<i>Serratia marcescens</i>	0,6	-	100% en 72 h	0,008

Microorganismo	Concentración inicial de cafeína (g/L)	Fuente de carbono (g/L)	% de degradación de cafeína	Tasa de degradación (g/L/h)
<i>Stemphyllium</i> sp.	0,19	Sucrosa (30.1)	100 % en 29 h	0,0053
<i>Pseudomonas putida</i>	5	-	95 % en 50 h	0,095
<i>Aspergillus tamari</i>	1,2	Sucrosa (28.4)	67.2 % en 48 h	0,0536
<i>Penicillium commune</i>	1,2	Sucrosa (28.4)	61.6 % en 48 h	0,0521

Fuente: Obtenido de Gokulakrishnan, Chandraraj, & Gummadi (2005).

Woolfolk en 1975; Blecher & Lingens en 1977 y Dash y Gummadi en 2006 identificaron al género *Pseudomonas*, como bacterias capaces de utilizar cafeína como única fuente de carbono y nitrógeno, con concentraciones de hasta 10 g/L.

### 1.5 Degradación químico – biológica de contaminantes (procesos en secuencia).

La degradación biológica de un producto químico se refiere a la eliminación del contaminante por la actividad metabólica de los organismos vivos, generalmente microorganismos y en particular bacterias y hongos que viven en el agua y el suelo (Oller et al., 2011). En este sentido, los procesos de degradación biológica, por sí solos, proporcionan resultados poco eficientes en cuanto al tiempo en comparación con los AOPs, por ejemplo, utilizando consorcios bacterianos para la degradación de Rojo Metilo como contaminante se obtuvo un 100 % de degradación en 6 horas; utilizando en tratamiento combinado se obtuvo un 100 % de degradación en 4 horas

(Waghmode et al., 2019). Otro ejemplo es el reportado por Khan et al., (2019) en el cual evaluaron la degradación de sulfolano utilizando lodos activos como tratamiento biológico en el cual el porcentaje de degradación fue del 100 % en 72 horas mientras que el tratamiento químico – biológico combinado fue del 100 % en 54 horas; los autores concluyen que hubo una reducción del 50 % en el tiempo de tratamiento en comparación con el tratamiento biológico solo (Khan et al., 2019).

Es notable que una opción viable para el tratamiento de aguas residuales biológicamente persistentes es el uso de tecnologías avanzadas basadas en oxidación química como los AOPs, ampliamente reconocidos como tratamientos altamente eficientes para aguas residuales recalcitrantes (Abd Kadir et al., 2013; Oller et al., 2011) y combinarlos para obtener mejores resultados. A continuación, en la *Tabla 6* se muestran diversos trabajos en los cuales se han realizado tratamientos combinados en secuencia y sus principales ventajas:

Tabla 6.

Ventajas de los tratamientos químico-biológicos combinados con diversos contaminantes.

Tratamiento biológico	Tratamiento químico (AOP)	Contaminante	Ventajas	% de degradación	Ref
	Radiación de haz de electrones	Alcohol polivinílico (PVA), DQO	Intermediarios generados por el tratamiento químico fueron bien utilizados por los microorganismos en el tratamiento biológico.	TS: 14 % de DQO t = 86 días TC: 45 % de DQO t = 86 días	Sun et al. (2016)
Biorreactores de membrana MBR	Fotoelectro-fenton (PEF)	Lixiviados de aguas residuales: DQO, DBO, nitrógeno amoniacal, fosfatos, sulfatos, sulfuros y cloruros	Aumento de la eficiencia en la remoción de los contaminantes estudiados, aplicando el tratamiento biológico después del tratamiento químico	TS: 71,9 % DBO, 83,6 % DQO, 100 % nitrógeno amoniacal, 58 % fosfato, 92,3 % sulfatos, 65 % sulfuros y 65 % cloruros  t = 6 días  TC:	Nivya & Pieus, (2016)

						90,2 % DBO, 96,2 % DQO, 100 % nitrógeno amoniaco, 82,7 % fosfato, 93,3 % sulfatos, 88,2 % sulfuros y 88,3 % cloruros
						t = 6 días
						TS: sin información
	Fotocatálisis – TiO <sub>2</sub>	UV	Bezacryl Amarillo (BZY)	Aumento de biodegradabilidad del contaminante	la del	TC: 100 % con TiO <sub>2</sub> P25 (10 y 20 mg L <sup>-1</sup> ) t = 120 – 300 min  Khenniche et al. (2015)
Lodos activados	Ozonización Fotocatálisis (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	– UV	Acetaminofén, antipirina, cafeína, carbamazepina, diclofenaco, hidroclorotiazida, ketorolaco, metoprolol y sulfametoxazol. TOC (Carbono Orgánico Total)	Aumento considerable de la biodegradabilidad (115 %) mediante fotocatálisis únicamente después de un tratamiento previo de ozonización		TS: Entre 3,4 y 6 % de TOC t = 3 horas  TC: 60 % de TOC t = 3 horas  Espejo, Aguinaco, García- Araya, & Beltrán (2014)



	Fotocatálisis UVC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sulfolano	Reducción del 50 % en el tiempo de tratamiento en comparación con el tratamiento biológico solo.	TS: sin información TC: 81 % ;100 % t = <24 h; <53 h Tratamiento biológico solo: 100 % en 72h	Khan, Yu, Achari, & Tay (2019)
Reactor Biológico Secuencial (SBR)	Fotoelectro-fenton (FEF)	DQO del agua residual	Reducción los periodos en la remoción DQO	TS: hasta 33 % t = 120 min TC: hasta 72 % t = 240 min	Xu et al. (2018)
			Aumento de la biodegradabilidad del contaminante con un tratamiento biológico en secuencia.	TS: hasta 70 %	
Consortios Bacterianos	Fotocatálisis UV – ZnO	Rojo (MR)	Metilo No se producen subproductos fitotóxicos. Reducción del tiempo de tratamiento en comparación con el tratamiento biológico solo.	TC: 100 % t = 4 horas Tratamiento biológico solo: 100 % en 6 horas	Waghmode et al. (2019)

**TS: tratamiento solo; TC: tratamiento combinado; t: tiempo.**

Elaborado por: El autor, 2020.

## Capítulo II

### 2 Marco metodológico

#### 2.1 Localización:

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, campus “El Girón” (Av. Isabel La Católica, s/n y Madrid).

#### 2.2 Selección de las mejores condiciones químicas para llevar a cabo la degradación fotocatalítica.

Para la selección de las mejores condiciones químicas para llevar a cabo la degradación fotocatalítica se planteó el diseño experimental mostrado en la *Tabla 7*.

Tabla 7.

Diseño experimental de la degradación fotoquímica.

Relación	pH			
TiO <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	4	7	9
<b>1-1</b>	y111	y121	y131	y141
	y112	y122	y132	y142
<b>2-1</b>	y211	y221	y231	y241
	y212	y222	y232	y242

Elaborado por: El autor, 2020

Los factores en estudio son el pH, que varía entre 1, 4, 7 y 9; y la relación entre el fotocatalizador (TiO<sub>2</sub>) y el agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en dos proporciones (1 a 1 y 1 a 2). Para cada tratamiento se realizaron dos repeticiones. La degradación fotoquímica del contaminante se la llevó a cabo en un reactor Techinstro ® que consta de un vaso reactor de vidrio de borosilicato, con capacidad de 500 mL. Consta de un sistema de enfriamiento mediante un vaso de las mismas

características conectado a un refrigerante. La lampara UV utilizada es de mercurio de 250 watts, con capacidad de trabajar en un rango de luz de 200 a 400 nm. En la *Figura 5* se muestra el equipo utilizado.



Figura 5. Fotoreactor Techinstro® utilizado para los ensayos de degradación fotocatalítica.  
Elaborado por: El autor, 2020

Por otro lado, los reactivos utilizados fueron: cafeína de grado analítico (> 99%) marca Sigma®, óxido de titanio forma anatasa marca Sigma®, ácido clorhídrico 5M e hidróxido de sodio 5M para ajustar el pH. El pH-metro utilizado fue de la marca Horiba®, versión “Laqua”.

El proceso de degradación se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una solución de 500 mL de cafeína (50 ppm) con agua oxigenada (1000 ppm), para el primer tratamiento (1 a 1); para el segundo tratamiento (2 a 1) se realizó una solución de 500 mL de cafeína (50 ppm) con agua oxigenada (500 ppm). Luego se ajustó el pH de la solución con HCl para alcanzar los valores de 1 y 4, y con NaOH para alcanzar los valores de 7 y 9 de acuerdo con el tratamiento. Una vez ajustado el pH se colocó la solución en el reactor y se añaden 500 mg de TiO<sub>2</sub> (1000 ppm), de esta manera se consigue tener una solución con:

i. Relación 1 a 1:

$$\frac{\text{TiO}_2}{\text{CAF}} = \frac{1000 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} \text{ y } \frac{\text{H}_2\text{O}_2}{\text{CAF}} = \frac{1000 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

ii. Relación 2 a 1:

$$\frac{\text{TiO}_2}{\text{CAF}} = \frac{1000 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} \text{ y } \frac{\text{H}_2\text{O}_2}{\text{CAF}} = \frac{500 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

Para el seguimiento de la concentración de cafeína en función del tiempo se empleó espectroscopia UV-Vis. En primera instancia, se realizó una curva de calibración de cafeína en un espectrofotómetro Shimadzu® UV-mini-1240 a una longitud de onda de 274 nm y se realizaron las mediciones a tiempo = 0 antes de empezar la reacción.

Para la primera repetición se realizaron mediciones cada 30 minutos durante 3 horas con el fin de obtener las curvas de degradación. De igual manera se realizó un blanco con el objetivo de comparar visualmente el efecto de las condiciones en estudio.

La segunda repetición se la realizó de manera continua durante tres horas. Al final del tiempo se midió la absorbancia para determinar el porcentaje de degradación.

## **2.3 Desarrollo de ensayos fotoquímicos – microbiológicos secuenciales para degradar la solución modelo de cafeína.**

### **2.3.1 Aislamiento y aclimatación de microorganismos degradadores de cafeína.**

Los microorganismos se aislaron de una muestra de suelo de un cultivo de café, ubicado en la ciudad de Caluma, provincia Bolívar. Se recolectaron 50 gramos de suelo superficial (10 cm de profundidad) y se colocaron en una bolsa de plástico, se mantuvo en refrigeración a 4°C por 10 horas hasta su transporte al laboratorio (INEN, 2014).

Posteriormente, 1 gramo de muestra se colocó en tubos de ensayo con 10 mL de un caldo de cultivo de enriquecimiento (CBM – *Caffeine Broth Medium*), el cual consistió en: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.8 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 g/L; NaCl, 0.58 g/L; Cafeína, 1.0 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.12 g/L; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.011 g/L y FeCl<sub>3</sub>, 0.016 g/L y se incubó durante 48 horas a 35°C. Luego, se centrifugó la muestra utilizando un vórtex y se traspasó el sobrenadante a 10 mL de un nuevo caldo de enriquecimiento. Se incubó durante 48 horas a 35°C. Se realizaron tres diluciones (10<sup>-</sup>

<sup>1</sup>,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) en el caldo de cultivo (CBM) y se sembraron cada una de estas por duplicado, en cajas Petri con el medio de cultivo CAM (Caffeine Agar Medium) que consistió en el mismo medio CBM pero con un 15 % (m/v) de agar, utilizando la técnica de vertido en placa (Dash & Gummadi, 2006; Gummadi & Santhosh, 2006).

Cada 96 horas se realizaron resiembras para aclimatar al microorganismo al consumo del contaminante. Se aislaron los microorganismos tomando en cuenta diferencias morfológicas y microscópicas.

### **2.3.2 Identificación de los microorganismos aislados**

Para la identificación de microorganismos, en primer lugar, se utilizó una prueba de oxidasa, la cual se basa en la oxidación del citocromo c reducido por acción de la enzima citocromooxidasa. En presencia de oxígeno molecular el sistema citocromooxidasa/citocromo c puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre otras el llamada reactivo NaDi (1-naftol + dimetilparafenilendiamina) con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol. De esta manera se puede clasificar e identificar bacterias. Su empleo se basa en una tira de ensayo que contiene los compuestos en donde la zona reactiva se colorea de azul a violeta azulado en contacto con cultivos puros de bacterias citocromooxidasa-positivas, como por ejemplo *Pseudomonas* sp (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011; Merck, 2007). Posteriormente, se realizó un ensayo bioquímico de identificación de bacterias. Estas pruebas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación (Bou et al., 2011). Algunas de estas pruebas son rápidas, otras requieren de 18 a 48 horas de incubación para poder observar los resultados. De manera general, se trata de pruebas basadas en la detección de componentes metabólicos o la determinación de la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada (Scola & Raoult, 2009). Se utilizó la prueba “Microgen GNA + B Oxidase Positive”, la cual consite en 36 pocillos en donde ocurren

las reacciones de identificación. Para identificar las bacterias se utilizó el software “Microgen-ID system”.

### 2.3.3 Ensayo de degradación biológica por lotes

Se evaluó la degradación de 50 ppm de cafeína, contenidos en 100 mL medio de cultivo CBM en matraces Erlenmeyer de 150 mL, se realizó un único tratamiento con tres repeticiones. Para la determinación de la concentración inicial del inóculo se realizó una curva de calibración, al preparar una escala de McFarland de 0,5 a 10 con una mezcla de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en diferentes proporciones (*Tabla 8*) y se midió la DO a 625 nm. Posteriormente se preparó la suspensión de microorganismos, colocando entre 20 a 25 colonias del microorganismo en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril hasta ajustar, con el espectrofotómetro, a una escala McFarland 0,5.

Tabla 8.

Escala McFarland.

Número de la turbidez estándar	Cloruro de bario dihidratado (1,175%)	Ácido sulfúrico (1%)	Densidad de bacterias aproximada correspondiente
0,5	0,5 mL	99,5 mL	$1 \times 10^8$
1	0,1 mL	9,9 mL	$3 \times 10^8$
2	0,2 mL	9,8 mL	$6 \times 10^8$
3	0,3 mL	9,7 mL	$9 \times 10^8$
4	0,4 mL	9,6 mL	$12 \times 10^8$
5	0,5 mL	9,5 mL	$15 \times 10^8$
6	0,6 mL	9,4 mL	$18 \times 10^8$

7	0,7 mL	9,3 mL	21 x 10 <sup>8</sup>
8	0,8 mL	9,2 mL	24 x 10 <sup>8</sup>
9	0,9 mL	9,1 mL	27 x 10 <sup>8</sup>
10	1,0 mL	9,0 mL	30 x 10 <sup>8</sup>

Fuente: Obtenido de Medicina & Laboratorio, Volumen 15, Números 11-12, 2009. Apéndice 2, pág. 559.

Se realizaron los ensayos de degradación por lotes inoculando el 5 % (v/v) de microorganismos a una escala McFarland de 0,5 (aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC) y se incubó a 35 °C a 150 rpm. Se realizaron mediciones en intervalos regulares tanto del crecimiento bacteriano a una DO<sub>625</sub> como del consumo de cafeína a una DO<sub>274</sub>.

#### **2.3.4 Degradación químico – biológica secuencial:**

Para la degradación químico – biológica se evaluó el producto de la degradación química que presentó el mayor porcentaje de degradación. De igual manera, se realizaron los ensayos por lotes en 100 mL de medio CBM en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se inoculó el 5% (v/v) de los microorganismos en proporción de 0,5 McFarland (aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC) y se incubó a 35 °C y 150 rpm. Se realizaron mediciones en intervalos regulares de la degradación de cafeína a una DO<sub>274</sub> (S. Dash & Gummadi, 2013). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **2.4 Evaluación de la degradación de cafeína con la aplicación secuencial de fotocatalisis y una técnica biológica.**

Para la evaluación del efecto sinérgico se compararon los resultados de los ensayos fotoquímicos solos, los ensayos microbiológicos solos y los ensayos fotoquímicos –

microbiológicos combinados. Se evaluó el porcentaje de degradación final, después del tratamiento.



## Capítulo III

### 3 Resultados y discusión.

#### 3.1 Selección de las mejores condiciones químicas para llevar a cabo la degradación fotocatalítica.

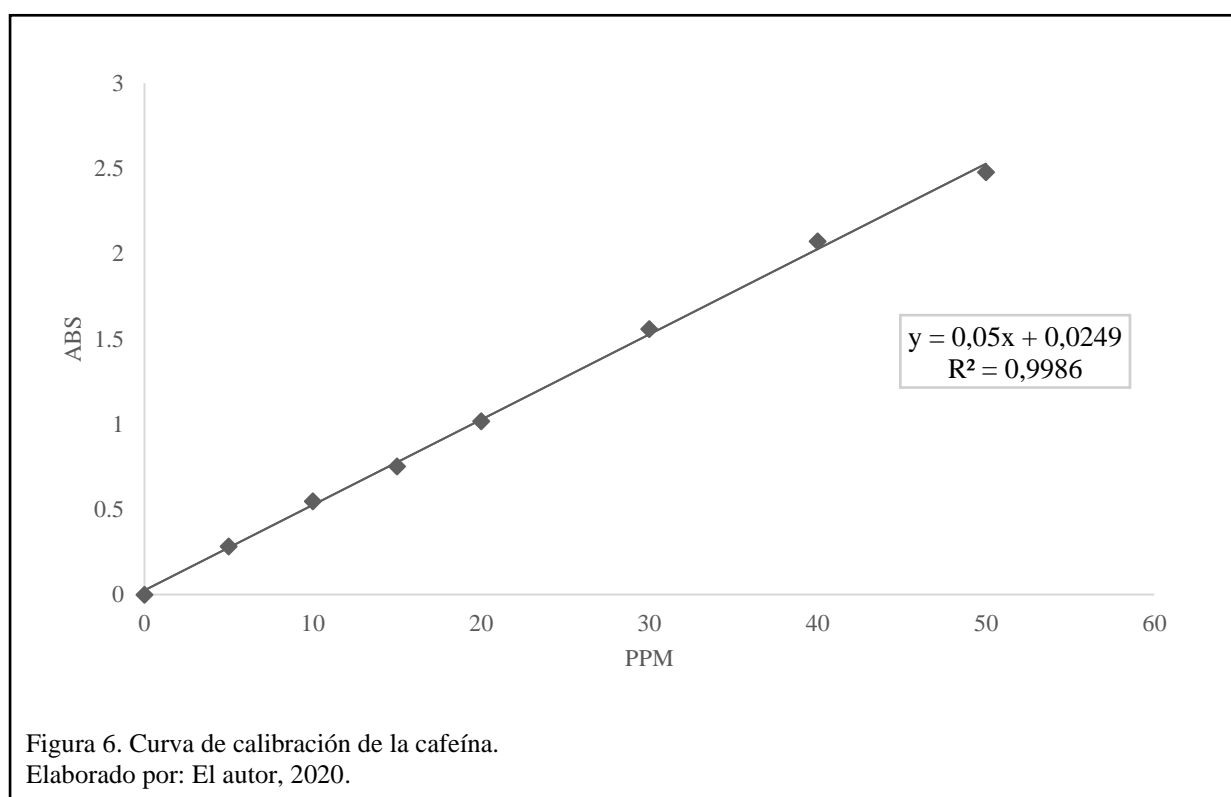
En la *Figura 6* se muestra la curva de calibración obtenida. La curva de calibración presenta un  $R^2$  ajustado de 99,8 %, lo cual permitió que se trabaje con ella. La ecuación de la recta se muestra en la ecuación 4

$$y = 0,0249 + 0,05 x \quad (4)$$

Donde  $y = \text{Abs}$ ,  $x = \text{Concentración [ppm]}$ .

La ecuación para el cálculo de la concentración en función de la curva de calibración es (ecuación 5):

$$x = \frac{y - 0,0249}{0,05} \quad (5)$$



Los resultados de la degradación fotoquímica se obtuvieron a través de la absorbancia, la cual se transformó en concentración con la ecuación 5. En la *Tabla 9* se muestran los resultados de la fotocatálisis después de 3 horas y en la *Figura 7* y *Figura 88*, se muestran las curvas de degradación normalizadas (en escala de 0 a 1) para las dos condiciones probadas. El porcentaje de degradación se determinó mediante la ecuación 6:

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{[\text{CAF}]_o - [\text{CAF}]_t}{[\text{CAF}]_o} \times 100 \quad (6)$$

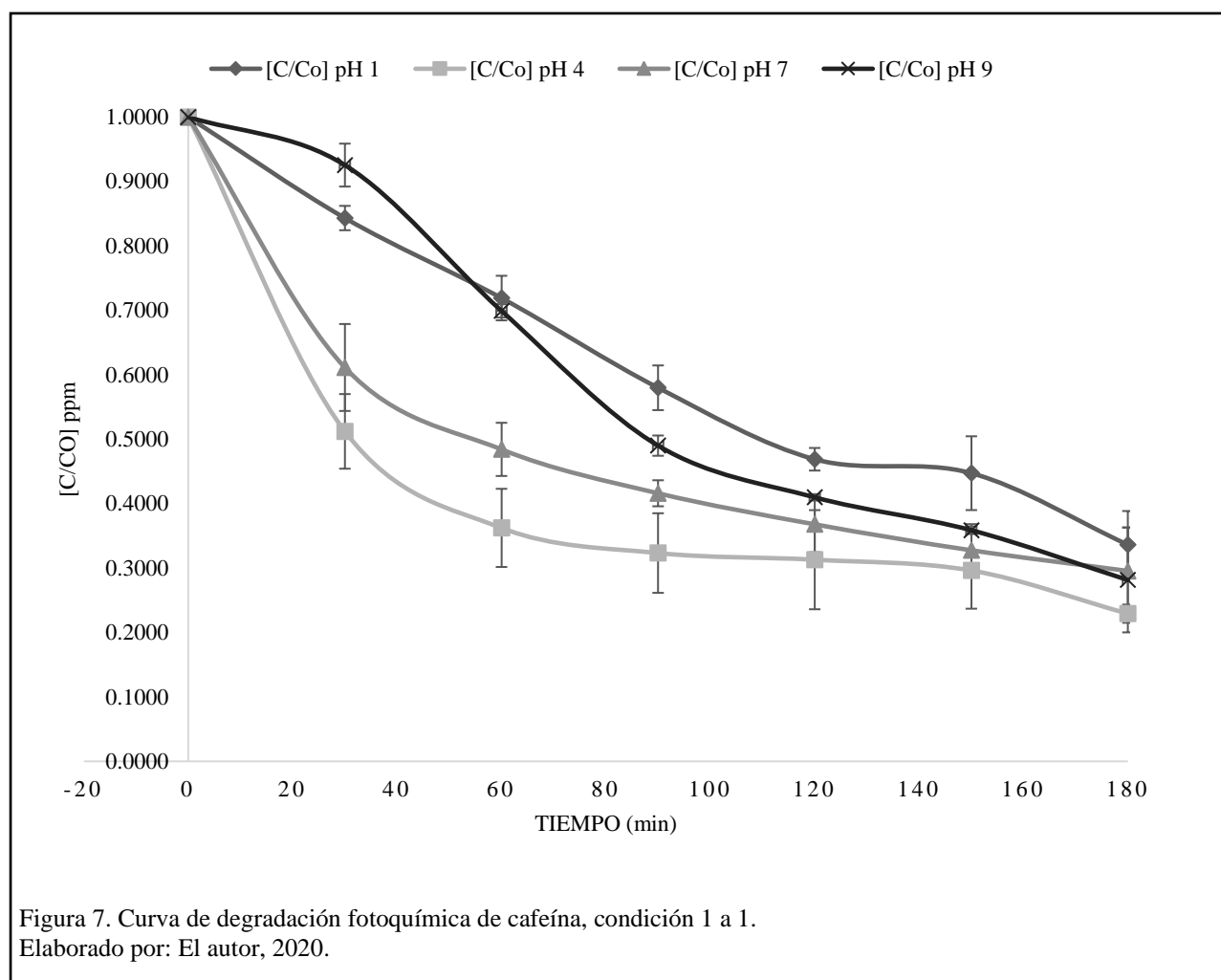
Tabla 9.

Resultados de la fotocatálisis heterogénea (degradación fotoquímica).

Relación	pH			
TiO <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	4	7	9
1-1	66 ± 5 %	77 ± 1 %	70 ± 7 %	72 ± 8 %
2-1	82 ± 1 %	88 ± 2 %	85 ± 1 %	81 ± 8 %

Elaborado por: El autor, 2020.

En primer lugar se evaluó la degradación de la cafeína a diferentes valores de pH; para la primera condición, la concentración de cafeína, de TiO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue 50, 1000 y 1000 ppm respectivamente. La tasa de degradación de cafeína a los 180 minutos fue de 77 ± 1 % a pH 4, siendo la mayor remoción de cafeína a estas condiciones (*Figura 7*). Los resultados mostraron una eficiencia máxima a pH ácido. Los alcaloides tienen carácter alcalino, es decir básico, dicha característica hace que se sean fuertemente atraídos a superficies con polaridad contraria (ácida) (Cruz, 2015).



Para la segunda condición, la concentración de cafeína,  $\text{TiO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue 50, 1000 y 500 ppm respectivamente. La cinética de la degradación, en estas, las mejores condiciones, determinó que la reacción sigue un orden 0, con una constante  $k = -0,1815$  y tiempo de vida medio  $t(0,5) = 140,15$  minutos. Se puede determinar que, teniendo en cuenta una constante baja ( $k = <0,001$ ) existen mayoritariamente especies del reactivo presentes en equilibrio. De igual manera, se puede determinar que la degradación es lenta y por ello, el tiempo de vida media de la degradación dio un valor cercano ( $\sim 140$  minutos) al tiempo total de la degradación 180 minutos (Levine, 2004). La remoción de cafeína a los 180 minutos mostró una tasa de degradación del 88 % a pH 4 (Figura 88). Al igual que en la primera condición, se tuvo la máxima eficiencia a pH ácido.

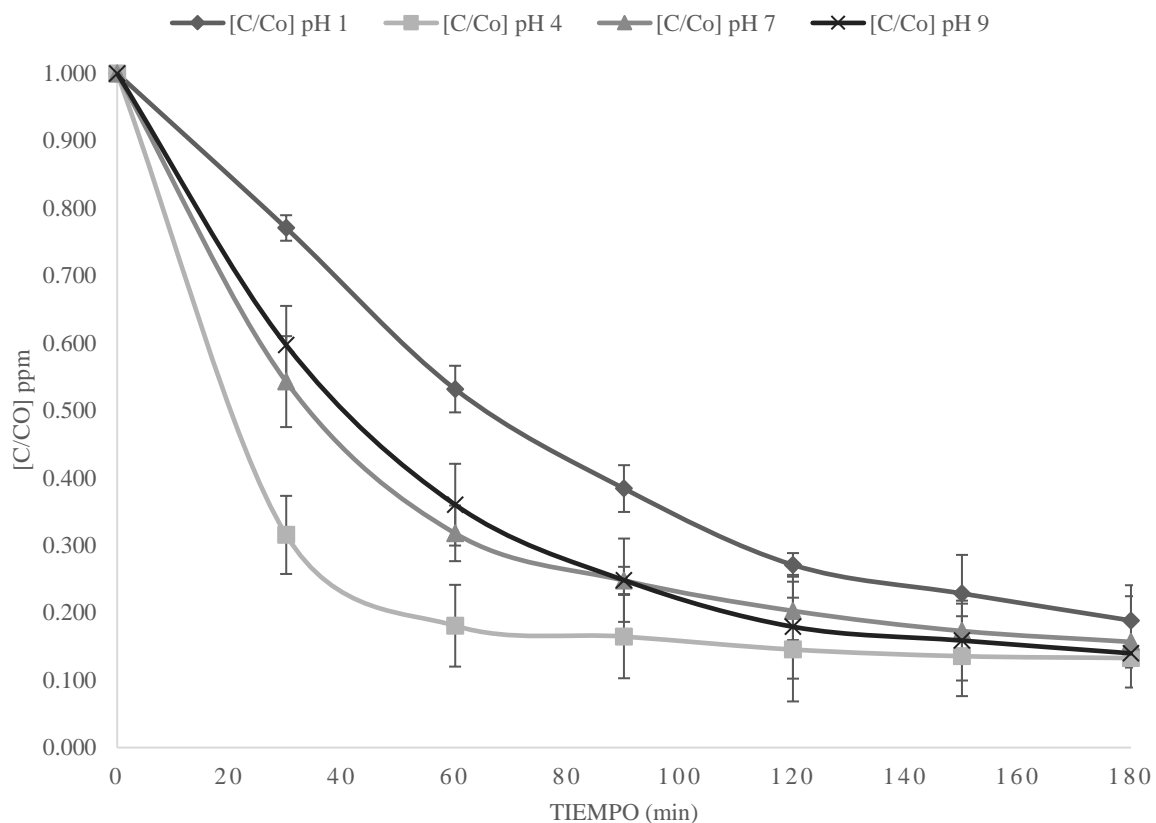
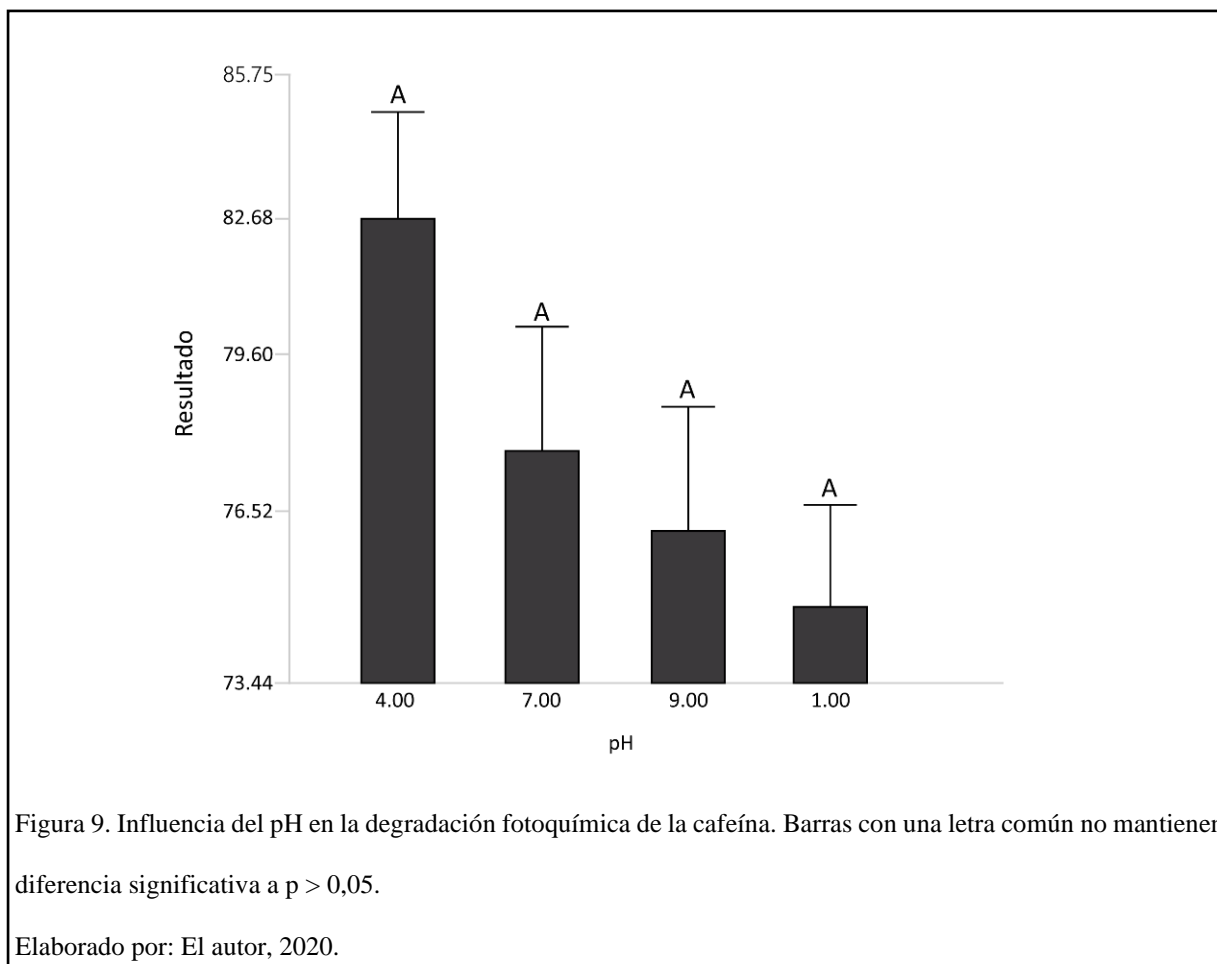


Figura 8. Curva de degradación fotoquímica de cafeína, condiciones 2 a 1.

Elaborado por: El autor, 2020

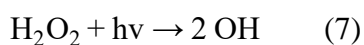
De acuerdo con Dixit, Mungray, & Chakraborty (2012) esto puede deberse a que el pH ácido hace que la superficie del fotocatalizador se cargue positivamente, por lo tanto, atrae la molécula contaminante que conduce a una mayor adsorción y, por lo tanto, a una mayor tasa de degradación. A pH básico, la superficie del fotocatalizador se carga negativamente y, por lo tanto, baja tasa de degradación (Dixit et al., 2012; Tanaka, Hisanaga, & Harada, 1989). Sin embargo, a pesar de que el pH en disolución acuosa puede afectar de manera significativa al comportamiento del fotocatalizador, se ha visto que no hay una dependencia excesivamente fuerte a valores de pH entre 4 y 10 (Cruz, 2015). A pesar de ello, el análisis estadístico que se realizó (ANOVA factorial) determina que a un nivel de significancia de 0,05 no existió

diferencia significativa entre los valores de pH para este estudio, es decir, el pH no es determinante para este estudio (*Figura 9*).



Es importante recalcar que

De igual manera, se determinó la influencia de la condición experimental, es decir, la relación de la concentración  $\text{TiO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la degradación de cafeína. De acuerdo con Dixit, Mungray, & Chakraborty (2012) el peróxido de hidrógeno es un oxidante muy eficiente. La degradación en este sistema tiene lugar a través de la formación de radicales hidroxilo que se forman según la ecuación 7 (Ghaly, Härtel, Mayer, & Haseneder, 2001).



Los radicales hidroxilo formados atacan al contaminante y lo degradan. La combinación de rayos ultravioleta y oxidante degrada eficientemente los compuestos en aguas residuales (Buxton, Greenstock, Helman, & Ross, 1988; Dixit et al., 2012). Los resultados que se obtuvieron muestran una mayor degradación en la segunda condición (*Figura 10*):

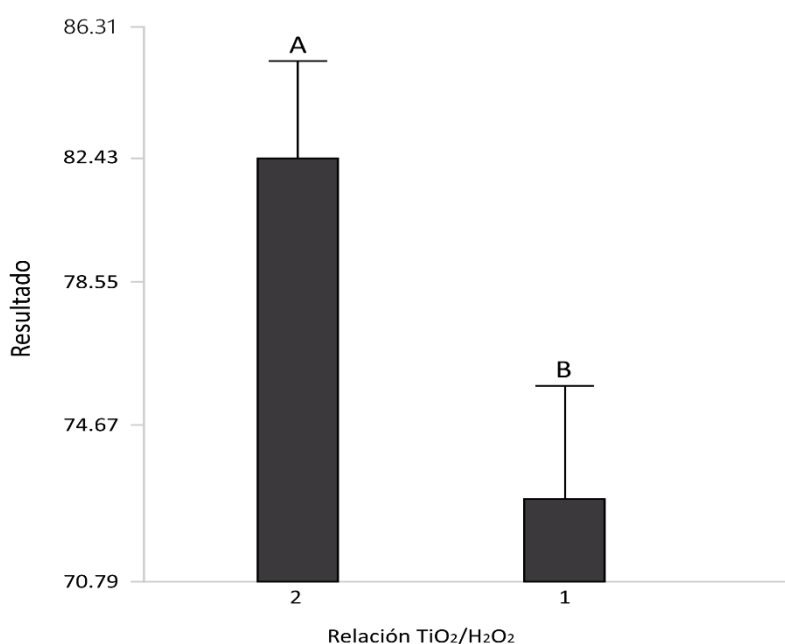
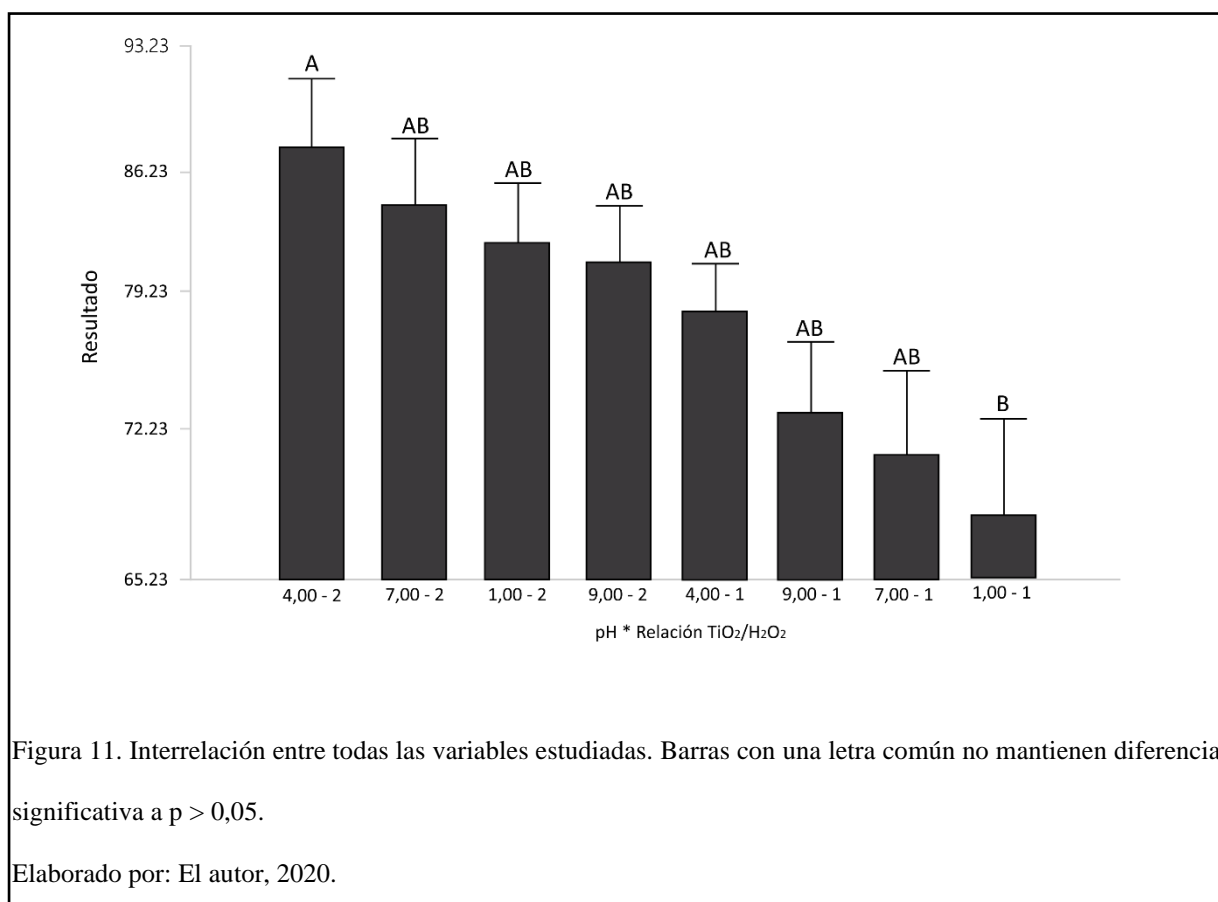


Figura 10. Influencia de la condición experimental (relación de fotocatalizador/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en la degradación fotoquímica de cafeína. Barras con una letra común no mantienen diferencia significativa a  $p > 0,05$ .

Elaborado por: El autor, 2020.

El aumento adicional de  $\text{H}_2\text{O}_2$  disminuye la tasa de degradación debido al exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con los radicales hidroxilo formados anteriormente y, por lo tanto, actúa como un agente inhibidor de la degradación al consumir los radicales hidroxilo responsables de la degradación de la molécula contaminante (Ghaly et al., 2001). Debido a esto, la concentración óptima de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para las condiciones estudiadas es de 500 ppm por cada 1000 ppm de  $\text{TiO}_2$ .

Por último se determinó la relación entre todas las variables que se estudió y se obtuvo que con la segunda condición a pH 4 hubo mayor degradación, a diferencia de las demás condiciones con una significancia de 0,05 (test ANOVA factorial). Esto se puede observar en la *Figura 11*.



A partir de estos resultados se determinó que las mejores condiciones para la degradación de 50 ppm del contaminante son realizando la degradación fotocatalítica con 1000 ppm de TiO<sub>2</sub> y 500 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 4. De igual manera se determinó que las peores condiciones para la degradación de la misma concentración del contaminante son realizando la degradación con 1000 ppm de TiO<sub>2</sub> y 1000 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 1. A pesar de que llevar a cabo la reacción a un pH ácido hace que la superficie del fotocatalizador se cargue positivamente lo cual permite una mayor tasa de degradación, mediante los resultados se ha determinado que un ambiente muy ácido (pH = 1) también inhibe la degradación como los pH básicos (7 y 9) (*Figura 1*). Sin

embargo, como se pudo observar en el análisis estadístico de la variable pH vs concentración, a un p valor de 0,005 el pH no es un factor determinante para la degradación en estas condiciones. Al final se obtuvo que el mayor porcentaje de degradación fue de 88 %.

### **3.2 Desarrollo de ensayos fotoquímicos – microbiológicos secuenciales para degradar la solución modelo de cafeína.**

#### **3.2.1 Aislamiento y mantenimiento de microorganismos degradadores de cafeína.**

##### **3.2.1.1 Caracterización macroscópica y microscópica**

Se aislaron los microorganismos a partir de una muestra de suelo después de realizar la incubación en el caldo de enriquecimiento (CBM) y realizar diluciones seriadas. En la *Figura 2* (Izq.) se muestra el crecimiento de los microorganismos que se obtuvieron en placas Petri con medio CAM de la segunda dilución ( $10^{-2}$ ).

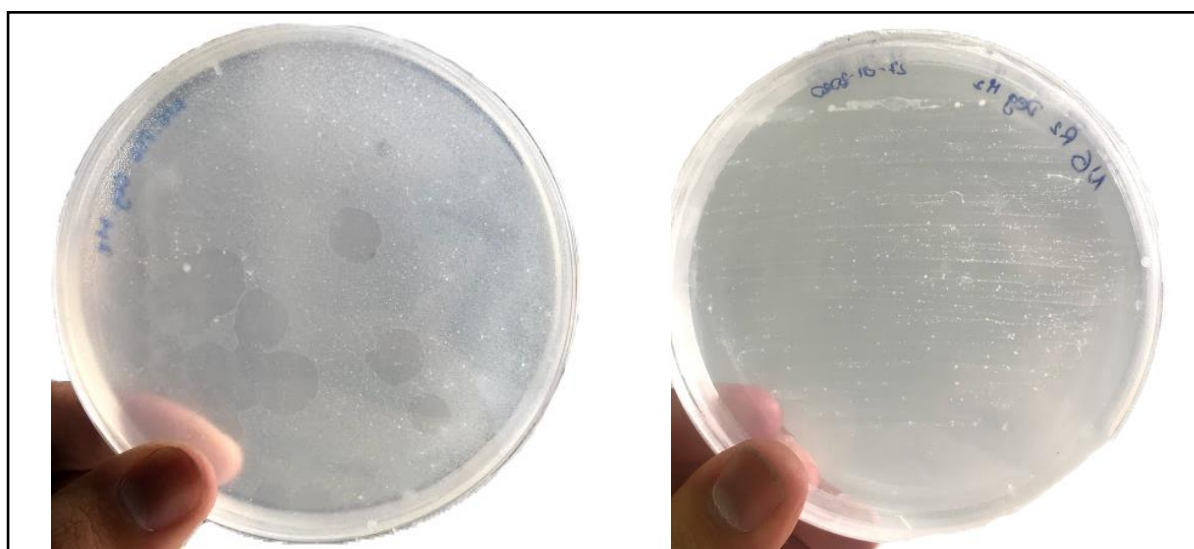
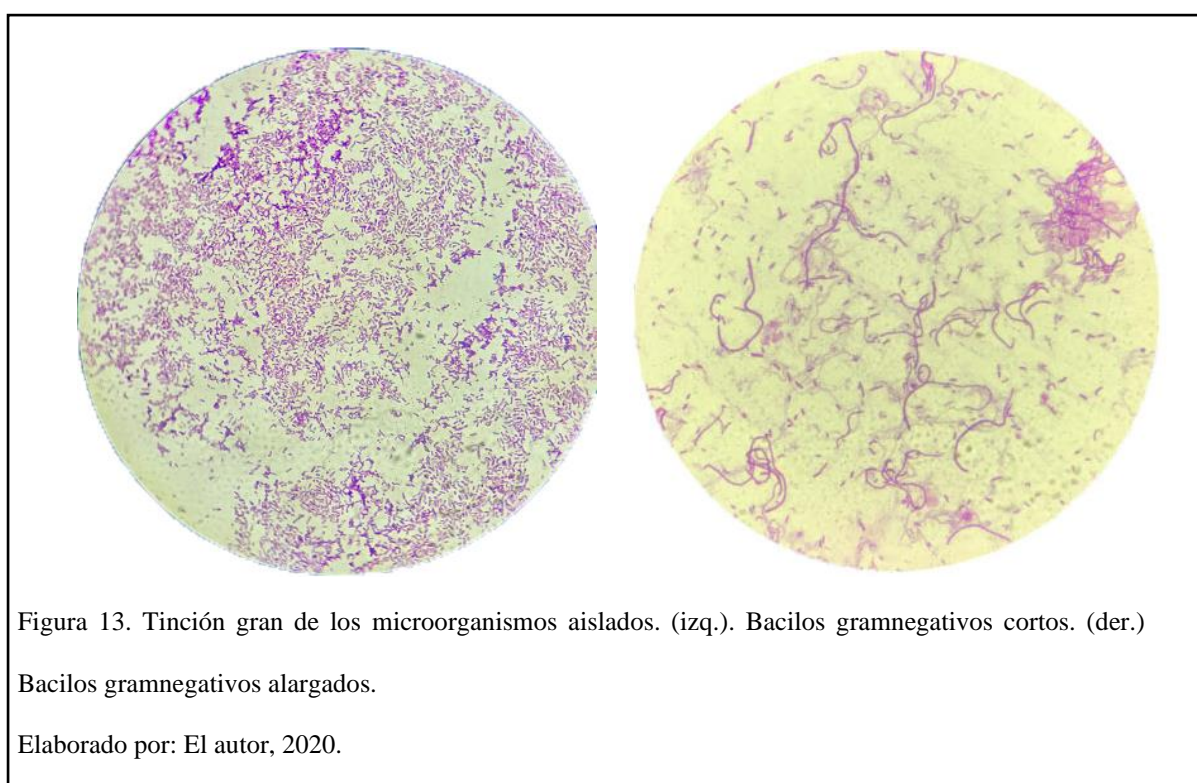


Figura 12. Microorganismos aislados en medios de cultivo CAM (Caffeine Agar Medium) de muestras de tierra con cultivos de café. (izq.) Vertido en placa (der.) Aislamiento.

Elaborado por: El autor, 2020.



Luego, se realizaron aislamientos sucesivos (*Figura 2, der.*) para identificar colonias aisladas por diferencias morfológicas de los microorganismos. Se pudieron apreciar varias colonias pequeñas, blancas - amarillas de crecimiento regular, circulares, translúcida y con elevación. Se realizó una tinción Gram para determinar la morfología básica de los microorganismos (*Error! Reference source not found.13*) donde se determinaron dos morfologías, una en forma de bacilos cortos (izq.) y otra en forma de bacilos alargados (der.). En ambos casos se determinaron bacilos gram negativos, en forma de varilla estrictamente aerobios.



### 3.2.1.2 Identificación bioquímica de los microorganismos aislados

.La prueba oxidasa resultó positiva, al observar el cambio en la coloración de blanco a azul, de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Merck, 2007), este cambio se da por la presencia del sistema citocromooxidasa/citocromo c en el cultivo, dando como resultado microorganismos oxidasa positivos (Babu, Patra, Thakur, Karanth, & Varadaraj, 2005). Los resultados de la identificación bioquímica “Microgen GNA + B Oxidase Positive” (ver Anexo 1) sugieren una identificación aceptable de *Pseudomonas fluorescens* (97,8 %).

Los resultados tanto morfológicos (Cappuccino & Sherman, 2014) como de identificación bioquímica sugiere que el aislado es *Pseudomonas*. En el estudio de Divine (2014), se ha mostrado que las especies de *Pseudomonas* utilizan la cafeína como única fuente de carbono y nitrógeno; específicamente se ha reportado el crecimiento de *Pseudomonas* sp. en medios de cultivo que contienen cafeína como única fuente de carbono (S. Dash & Gummadi, 2013; S. S. Dash & Gummadi, 2006; Gokulakrishnan, Chandraraj, & Gummadi, 2007).

### 3.2.2 Ensayo de degradación biológica por lotes

#### 3.2.2.1 Curva de crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento de los microorganismos en la cual se observó su crecimiento por nefelometría a 625 nm. La curva fue realizada al mismo tiempo que la degradación biológica, con las mismas condiciones (50 ppm de cafeína, 150 rpm y 35 °C) en un medio de cultivo CBM. Las mediciones fueron tomadas cada 2 horas durante 8 horas y luego a las 20 horas, cada 2 horas también. Se observa un crecimiento exponencial a partir de las 8 horas de cultivo, que se mantiene hasta las 30 horas de ensayo. Esto se puede observar en la Figura 14.

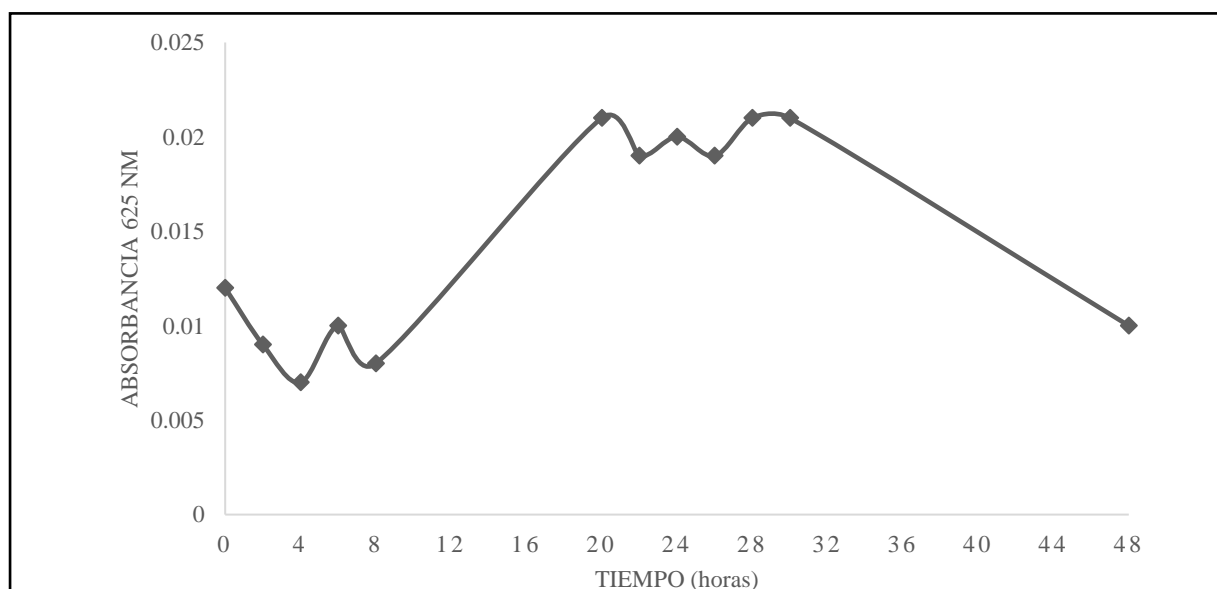


Figura 14. Curva de crecimiento de los microorganismos.

Elaborado por: El autor, 2020.

### 3.2.2.2 Ensayo por lotes

Se evaluó la degradación biológica de una solución de cafeína (50 ppm) en medio de cultivo CBM. A las 2 horas de iniciado el ensayo hubo una degradación del  $2 \pm 1$  % luego a las 6 horas del ensayo hubo un porcentaje de degradación de  $13 \pm 3$  %. Debido a limitaciones en el tiempo de estancia en el laboratorio se midió al siguiente día, después de 20 horas de iniciado el ensayo. La cinética de la degradación determinó que la reacción sigue un orden 0, con una constante  $k = -0.1815$  y tiempo de vida medio  $t(0,5) = 11,4$  horas. El máximo porcentaje de degradación fue de:  $87 \pm 2$  % a las 22 horas de ensayo. A partir de este tiempo la solución mantiene su concentración. En la *Figura 15* se muestra la curva de degradación normalizada  $[C/Co]$  en relación con el tiempo; en la *Figura 1Error! Reference source not found.6* se muestra la curva de degradación de cafeína. Se midió también una solución de 50 ppm de cafeína sin microorganismos como control.

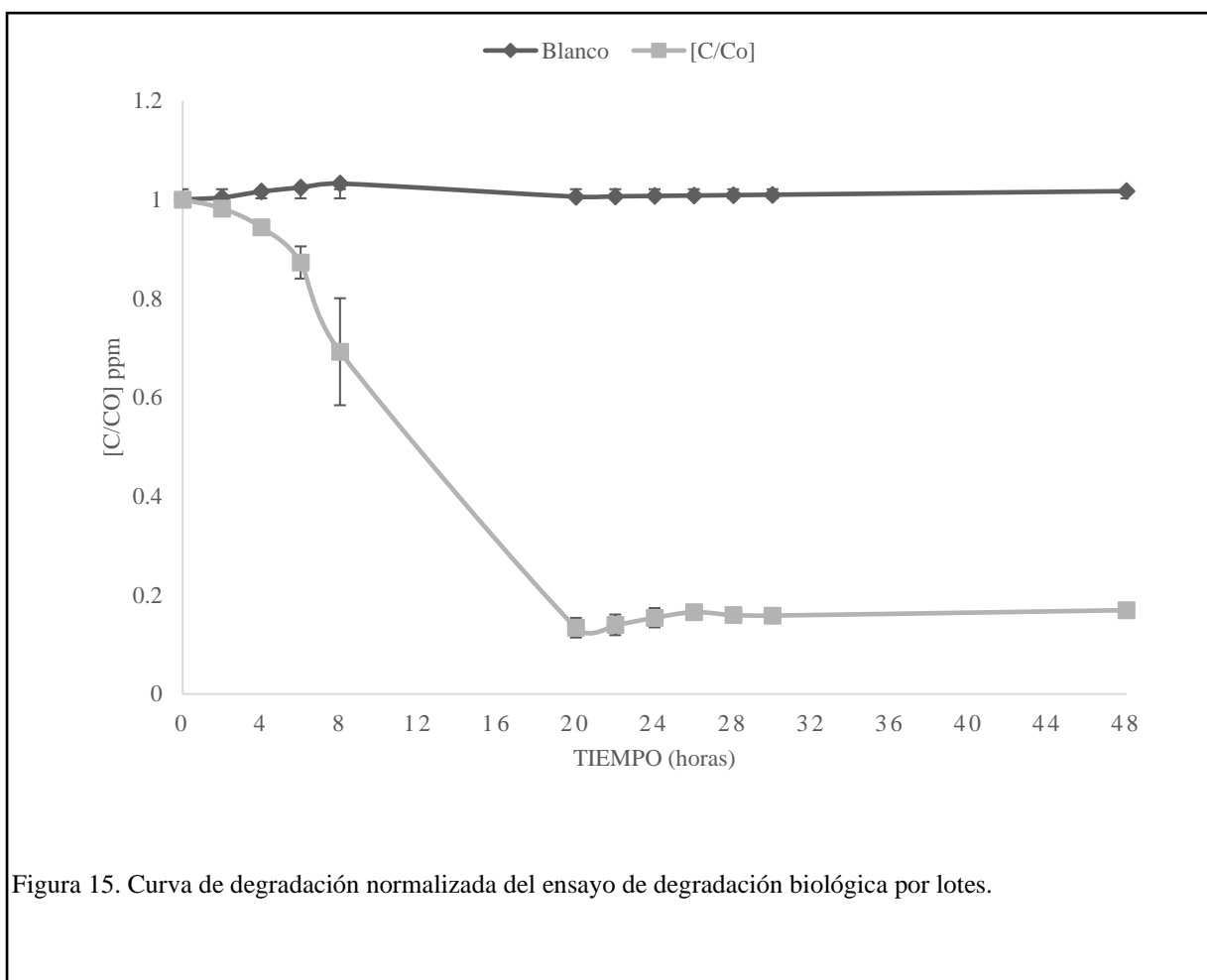
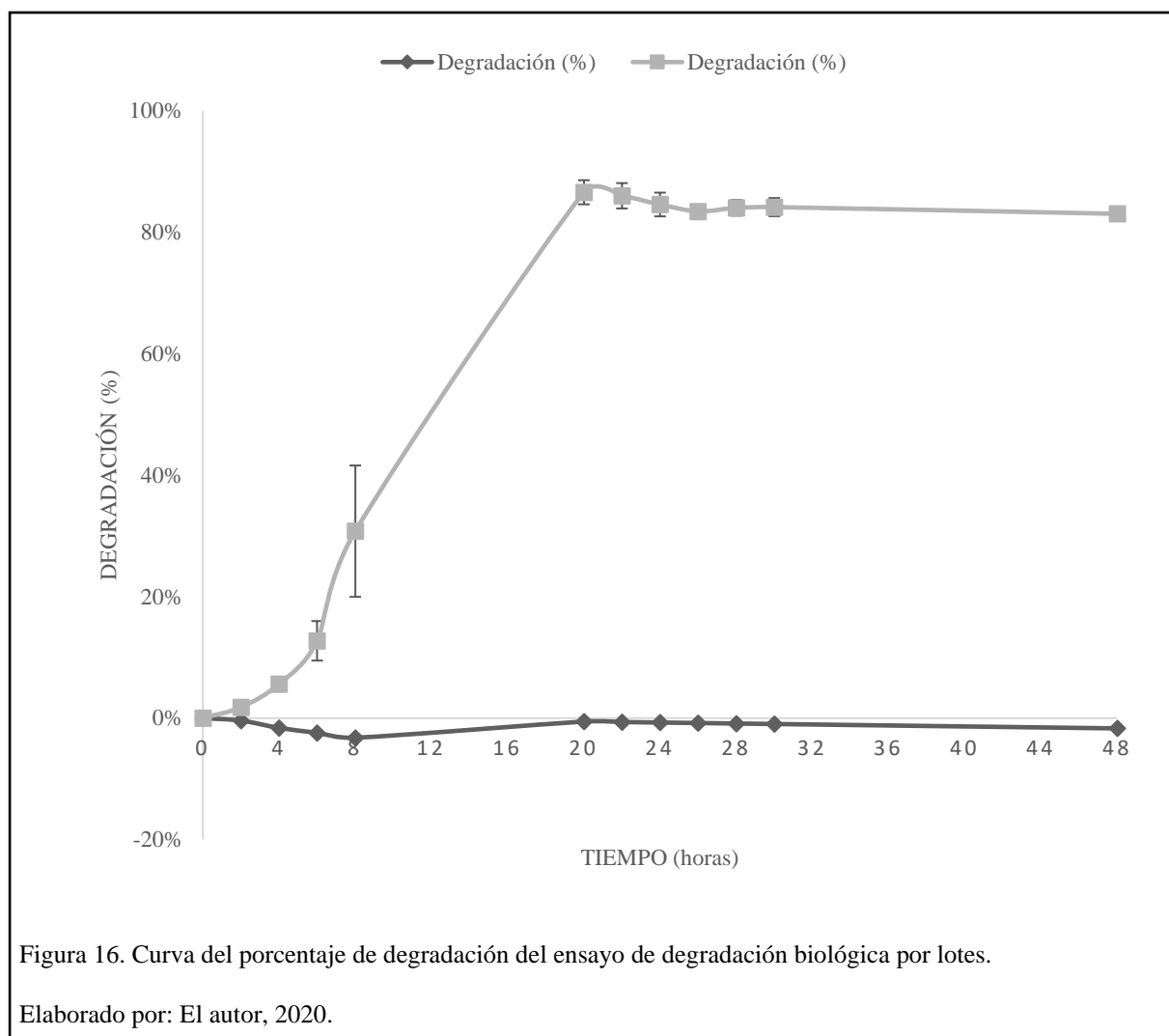


Figura 15. Curva de degradación normalizada del ensayo de degradación biológica por lotes.



La cinética de la reacción ( $k < 0,001$ ) muestra que en la solución existe mayoritariamente especies de reactivo presentes en equilibrio, la degradación es rápida al inicio y por ello los tiempos de vida media dan valores bajos en comparación con el tiempo de duración total del ensayo (Levine, 2004). Diversos estudios muestran que altas concentraciones de cafeína en el medio de cultivo (>2500 ppm) inhiben el crecimiento bacteriano y por ende la degradación de la misma (Babu et al., 2005; Gokulakrishnan et al., 2007; Gokulakrishnan & Gummadi, 2006). Se han reportado porcentajes de degradación de 53 %, 45 % y 30 % en concentraciones de 200, 400 y 500 ppm de cafeína respectivamente. (Babu et al., 2005). En otros estudios se ha

empezado la degradación de cafeína en ensayos por lotes utilizando concentraciones desde 100 a 2500 ppm observándose porcentajes de degradación del 100 % en 5 – 7 días después del estudio. (Babu et al., 2005; Gokulakrishnan & Gummadi, 2006; Mazzafera, Olsson, & Sandber, 1996; Yu, Kale, Gopishetty, Loui, & Subramanian, 2008; Yu et al., 2009). Babu et al (2005) ha reportado una degradación de 1000 ppm de cafeína en 4 horas, bajo las mismas condiciones de este trabajo, mientras que en el presente estudio se reportó un porcentaje de degradación de 87 % en 20 horas, manteniéndose después invariable, como se observa en la Figura 16. La degradación obtenida se encuentra dentro de los rangos de tiempo y porcentaje de degradación obtenidos en otros estudios (Babu et al., 2005; Mazzafera et al., 1996; Yu et al., 2008).

Es importante señalar que el tiempo de aclimatación de los microorganismos utilizados en este estudio fue menor a los reportados por diferentes autores (Babu et al., 2005; Gokulakrishnan et al., 2005; Mazzafera et al., 1996) quienes obtuvieron una degradación completa. Dichos microorganismos han sido aclimatados al menos por dos años, mientras que el tiempo de aclimatación de los microorganismos utilizados fue menor a un año.

En cuanto a los microorganismos identificados, se ha reportado que existen diferentes bacterias capaces de degradar cafeína: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* TPS8 degradó el 80 % del contaminante contenidos en 2500 ppm de cafeína en 72 horas (Ashengroph & Ababaf, 2014); de igual manera, *Pseudomonas* spp. GSC1182 degradó el 80 % de cafeína en 48 h cuando la cafeína fue la única fuente de carbono, al igual que en este estudio. En ambos casos, la procedencia de los microorganismos fue de cultivos de café, de igual manera que en el presente estudio.

### 3.3 Evaluación del efecto sinérgico entre la degradación fotocatalítica y la degradación microbiológica de la cafeína

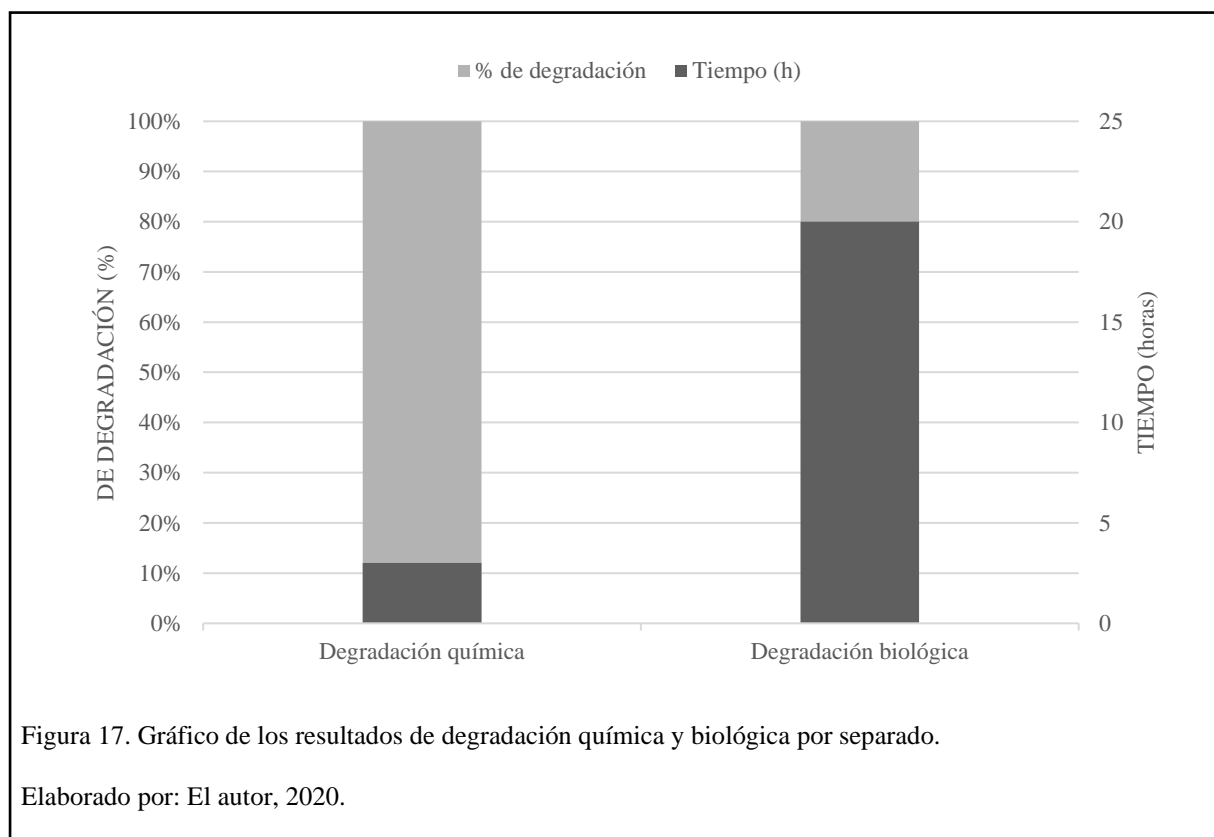
Se evaluaron, en primer lugar, los ensayos de degradación por separado, es decir se evaluó el ensayo de degradación químico solo y el ensayo de degradación biológico solo. En la *Tabla 10* se muestra el resumen de los resultados de degradación química y biológica discutidos anteriormente y en la *Figura 17* se muestra el gráfico del resultado.

Tabla 10.

Resumen de los resultados de degradación química y biológica por separado.

	Tiempo	% de degradación
<b>Degradación química</b>	3 horas	88 $\pm$ 2
<b>Degradación biológica</b>	20 horas	87 $\pm$ 2

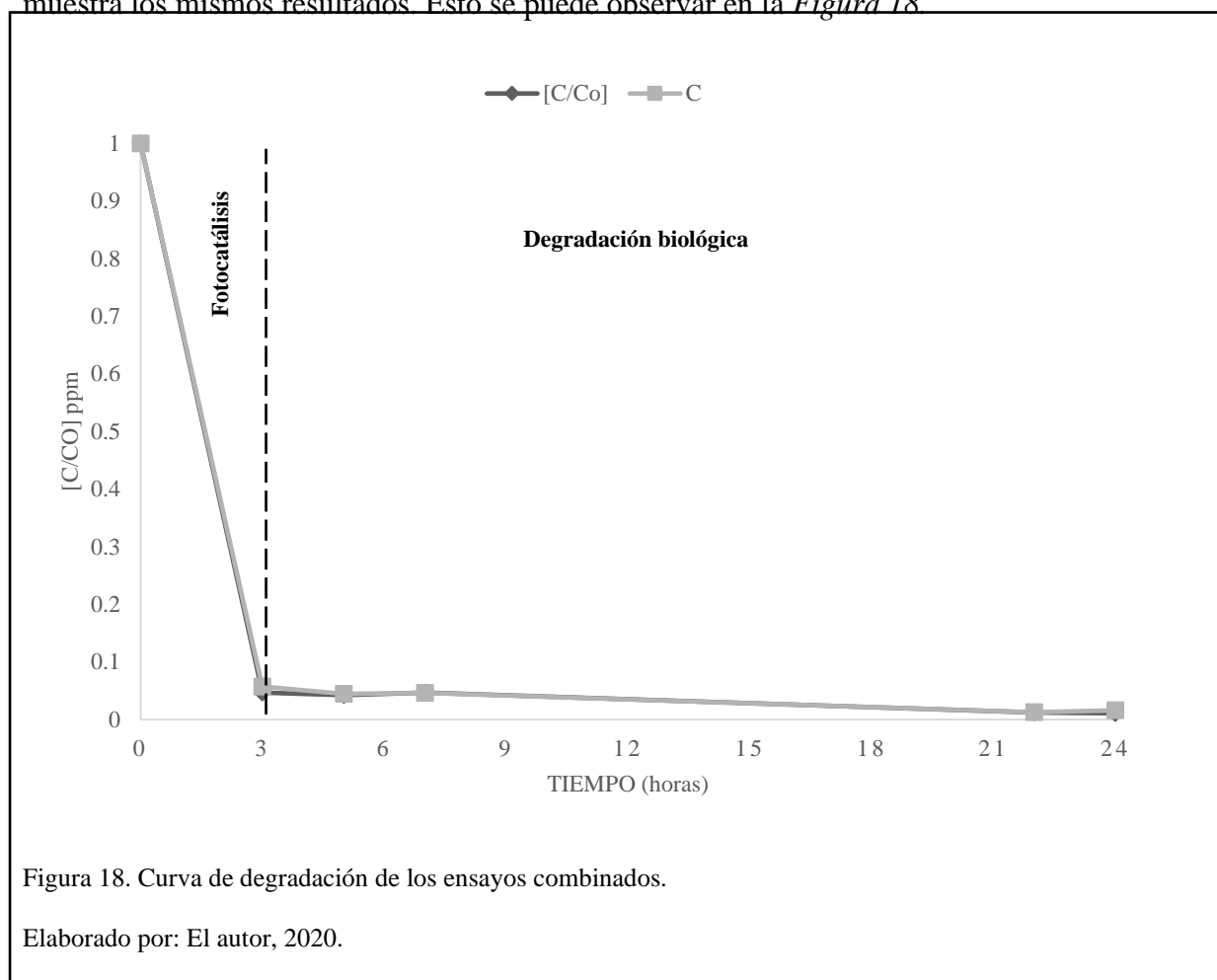
Fuente: El autor, 2020



Se determinó que el porcentaje de degradación es similar en los dos ensayos, sin embargo, el tiempo es diferente. La degradación química alcanza un 88 % en tres horas mientras que la degradación biológica sola alcanza un 87 % en 20 horas. En la sección anterior se discutió acerca de los porcentajes de degradación obtenidos en diversos estudios, en cuanto a la degradación química, los trabajos que se han realizado difieren todos en sus condiciones de estudio, por ejemplo, Marques et al. (2013) realizaron un estudio de degradación fotocatalítica de cafeína, realizando diferentes configuraciones con nanotubos de carbón. En dicho estudio se determinó que hubo un 100 % de degradación en 30 minutos. Otro ejemplo de la versatilidad que existe en los ensayos de degradación fotocatalítica de contaminantes es el de Elhalil et al. (2018) en donde se probó con diferentes concentraciones iniciales de cafeína, así como diferentes fotocatalizadores; la condición que más se aproxima a lo realizado en este estudio es la degradación fotoquímica de 20 ppm de cafeína, a pH 7 y con 300 ppm de  $\text{TiO}_2$ , en donde se obtuvo un 90 % de degradación en 150 minutos (Elhalil et al., 2018). Por último, Almeida, Lenzi, Pietrobelli, & Onélia (2019) realizaron la foto degradación con  $\text{TiO}_2$  modificado con hierro y plata; realizaron una prueba con  $\text{TiO}_2$  en donde obtuvieron valores muy bajos de degradación (>50 %) sin embargo, esto se debe a que utilizaron un  $\text{TiO}_2$  cuya forma cristalina fue rutilo, la cual no es óptima para los ensayos de degradación (Wang et al., 2017). El  $\text{TiO}_2$  utilizado en el presente estudio fue de forma anatasa.

Una vez que se obtuvieron los resultados de los ensayos de degradación por separado se realizó el ensayo combinado. Se aplicó inicialmente el tratamiento químico por fotocatálisis en las condiciones de 2 a 1 a pH 4, obteniendo una degradación del 90 % en tres horas. Posteriormente se inocularon los microorganismos en una concentración de McFarland 0,5 y se incubó a las mismas condiciones ya probadas anteriormente: 35°C a 150 rpm por triplicado. La concentración inicial de cafeína para el ensayo biológico fue de  $5 \pm 2$  ppm.

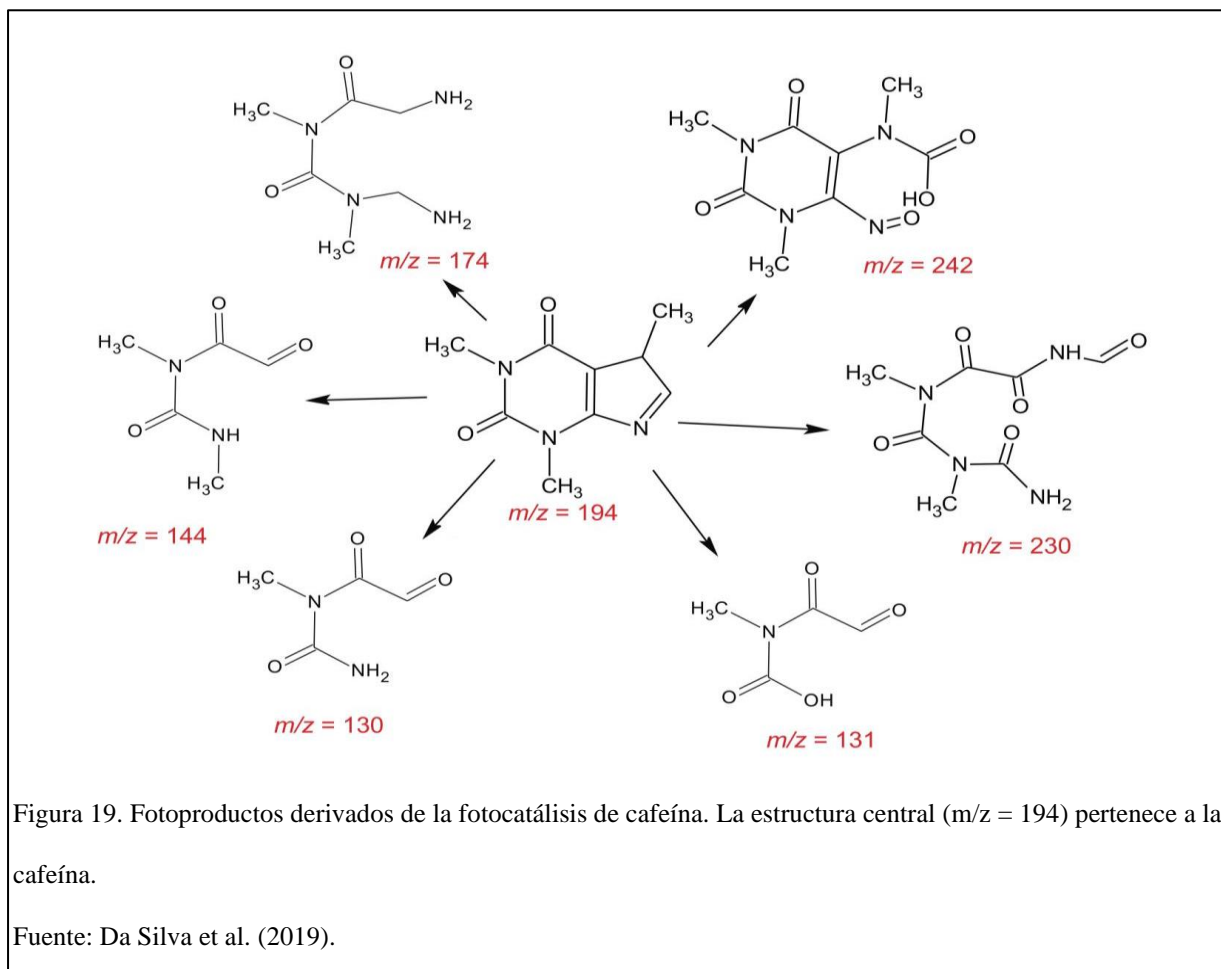
A las 24 horas de iniciado el estudio se observa que, a pesar de que la concentración de cafeína disminuyó hasta un mínimo de ~1 ppm, dicha degradación no puede ser asociada a la presencia de microorganismos ya que la curva control (resultado de la fotocátalisis sin microorganismos) muestra los mismos resultados. Esto se puede observar en la *Figura 18*.



Se esperaba que en cuanto se realice un ensayo de degradación secuencial se observe un efecto simultáneo, como es el caso del estudio de Waghmode (2019) (*Tabla 6*); en el cual se realiza un ensayo fotocatalítico seguido de un ensayo biológico para la decoloración de rojo fenol, se obtuvo que dicha decoloración aumentó en un 100%, obteniéndose así una mayor tasa de degradación que los ensayos solos (Waghmode et al., 2019). Sin embargo, al evaluar los resultados y sobre todo al observar que no existe ninguna diferencia entre la curva de degradación y el control se determinó que no hay tal efecto sinérgico observable.



Otros resultados muestran que, al utilizar de igual manera la fotocatálisis como un pretratamiento, pero para la degradación de ciproconazol combinada con una degradación biológica con *Pseudomonas fluorescens* se encontraron fotoproductos estructuralmente similares al contaminante, lo que podría explicar la ausencia de biodegradabilidad de la solución irradiada (Yahiat, Fourcade, Brosillon, & Amrane, 2011). En un estudio de Da Silva et al. (2019) todos los fragmentos, producto de la fotocatálisis, fueron detectados por espectroscopía de masas e implicaron la apertura de los anillos de pirimidina e imidazol, excepto el fragmento con  $m/z$  242 que implicó solo la apertura del anillo de imidazol y la oxidación de los grupos resultantes terminales (*Figura 19***Error! Reference source not found.**). En la mayoría de los fotoproductos se puede apreciar únicamente la apertura de los anillos, siendo su estructura similar a la de la cafeína (Da Silva et al., 2019). Esto con relación al presente estudio en el que no se obtuvo ninguna otra degradación después de la reacción fotocatalítica puede estar relacionado a que los fotoproductos son similares a la cafeína, por lo cual no se aprecia ningún cambio en la solución.



La razón por la cual se observa que el control también presenta una degradación puede ser debido a que el contaminante es atraído fuertemente a la superficie del catalizador y de esta forma el proceso continuará funcionando a concentraciones muy bajas (Ibhadon & Fitzpatrick, 2013). En este estudio se obtuvo un porcentaje de degradación final de 99%, sin embargo el proceso fotocatalítico – biológico secuencial para cafeína a las condiciones experimentales probadas no se puede atribuir al efecto de las dos variables probadas, debido a que la reacción sigue sin la presencia de los microorganismos. Se puede inferir que dicho efecto puede ser causado debido a los fotoproductos dañinos (Wang et al., 2018).

Los fotoproductos tóxicos pueden tener varios efectos adversos en una amplia gama de organismos, entre otros, inhibir la actividad de las bacterias luminiscentes (Cao et al., 2009), de igual manera las concentraciones y toxicidades de los fotoproductos generados por fotólisis

directa u oxidación indirecta varían con los cambios en los parámetros operativos, como la influencia de los rayos UV, la dosis de oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$  o fotocatalizador) y el pH de la solución (Wang et al., 2018). Es muy difícil analizar experimentalmente la toxicidad de la mayoría de los fotoproductos primarios, debido a la falta de químicos puros (Lambropoulou, Evgenidou, Saliverou, Kosma, & Konstantinou, 2017). Algunas investigaciones han tratado de determinar la relación entre los cambios en la toxicidad y la evolución de los fotoproductos primarios durante la oxidación UV /  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la fotocatálisis UV. Se ha determinado de manera experimental la toxicidad de los fotoproductos primarios de una serie de contaminantes emergentes, sin embargo, de cafeína no se lo ha hecho todavía (Antonopoulou & Konstantinou, 2016; Lambropoulou et al., 2017). En el presente estudio no se ha conseguido evaluar la ventaja de la aplicación de procesos químico – biológicos secuenciales en las condiciones probadas, sin embargo queda aún por investigar diferentes tipos de tratamientos y variables para determinar un ensayo exitoso que implique una efectiva degradación del contaminante en el menor tiempo posible y con la menor cantidad de fotoproductos tóxicos generados.

## Conclusiones

Se realizaron los ensayos de degradación fotocatalítica de 50 ppm cafeína, en los cuales se obtuvo como mayor porcentaje de degradación ( $88 \pm 2 \%$ ) en 3 horas con las siguientes condiciones: 1000 ppm de  $\text{TiO}_2$ , 500 ppm de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a pH 4.

Se aisló una cepa de microorganismos de una muestra de tierra de un cultivo de café en un medio basal cuya única fuente de carbono fue la cafeína, se obtuvo microorganismos degradadores de cafeína; de acuerdo con la estructura morfológica, comparada con la bibliografía y el ensayo de identificación bioquímica “Microgen GNA + B Oxidase Positive” se determinó que los microorganismos utilizados pertenecen al género *Pseudomonas*.

Se realizaron los ensayos de degradación biológica por lotes obteniéndose un porcentaje de degradación de 50 ppm de cafeína de  $87 \pm 2 \%$ , en 20 horas con las siguientes condiciones: 150 rpm y  $35^\circ\text{C}$ .

Se realizó el ensayo de degradación fotoquímico – biológico secuencial obteniéndose un porcentaje de degradación máximo de  $99 \pm 1 \%$  que no se puede atribuir a la degradación por microorganismos, debido a que en la solución control se observa la misma degradación luego del tiempo de estudio (24 horas). Se infiere que la presencia de fotoproductos tóxicos en solución impide el crecimiento de los microorganismos, sin embargo, esto aún se debe determinar.

### **Recomendaciones**

Continuar con la identificación de los microorganismos aislados y utilizados en el presente estudio ya que se ha comprobado que utilizan a la cafeína como única fuente de carbono y nitrógeno.

Realizar los ensayos combinados con una mayor cantidad de contaminante para verificar la biodegradabilidad de cafeína luego de la irradiación de luz UV en presencia de un catalizador (fotocatálisis).

Analizar por métodos instrumentales los subproductos derivados de la fotorreacción y así verificar la capacidad de asimilación de estos por los microorganismos utilizados.

## Referencias

- Abd Kadir, S. L., Yaakob, H., & Mohamed Zulkifli, R. (2013). Potential anti-dengue medicinal plants: A review. *Journal of Natural Medicines*, 67(4), 677–689. <https://doi.org/10.1007/s11418-013-0767-y>
- Almeida, L. N. B., Lenzi, G. G., Pietrobelli, J. M. T. A., & Onélia, A. A. (2019). Degradation of Caffeine by Heterogeneous Photocatalysis Using TiO<sub>2</sub> Impregnated with Fe and Ag, 74(October 2018), 1531–1536. <https://doi.org/10.3303/CET1974256>
- Antonopoulou, M., & Konstantinou, I. (2016). Photocatalytic degradation and mineralization of tramadol pharmaceutical in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions: Evaluation of kinetics, mechanisms and ecotoxicity. *Applied Catalysis A: General*, 515, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2016.02.005>
- Arlos, M. J., Liang, R., Hatat-Fraile, M. M., Bragg, L. M., Zhou, N. Y., Servos, M. R., & Andrews, S. A. (2016). Photocatalytic decomposition of selected estrogens and their estrogenic activity by UV-LED irradiated TiO<sub>2</sub> immobilized on porous titanium sheets via thermal-chemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.048>
- Ashengroph, M., & Ababaf, S. (2014). Biodecaffeination by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* TPS8 , an Isolated Strain from Tea Plantation Soil, 24(4), 305–312.
- Ashihara, H., & Crozier, A. (2001). Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in Plant Science*, 6(9), 407–413. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02055-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02055-6)
- Babu, V. R. S., Patra, S., Thakur, M. S., Karanth, N. G., & Varadaraj, M. C. (2005). Degradation of caffeine by *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(6), 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.022>
- Barceló, D., & López, M. J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de

- los contaminantes emergentes. *Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales - CSIC*, 4(2), 125–128. <https://doi.org/10.1097/ICB.0b013e3181ad3957>
- Blecher, R., & Lingens, F. (1977). The Metabolism of Caffeine by a *Pseudomonas putida* Strain
- \* Summary : 1 ) A bacterium capable of growing aerobically from soil . The morphological and physiologi- cal characteristics of the bacterium were ex- amined . The organism was identified as a stra, 807–818.
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1–3), 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Buckley, D., Bender, D., Stahl, D., Martinko, J., & Madigan, M. (2015). *Brook. Biología de los microorganismos*.
- Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1988). Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$  in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(2), 513–886. <https://doi.org/10.1063/1.555805>
- Cao, N., Yang, M., Zhang, Y., Hu, J., Ike, M., Hirotsuji, J., ... Sei, K. (2009). Evaluation of wastewater reclamation technologies based on in vitro and in vivo bioassays. *Science of the Total Environment*, 407(5), 1588–1597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.048>
- Cappuccino, J. (SUNY R. C. C., & Sherman, N. (SUNY R. C. C. (2014). *Microbiology: a laboratory manual*.
- Cédat, B., de Brauer, C., Métivier, H., Dumont, N., & Tutundjan, R. (2016). Are UV photolysis

- and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. *Water Research*, 100, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.040>
- Cosenza, A., Maida, C. M., Piscionieri, D., Fanara, S., Di Gaudio, F., & Viviani, G. (2018). Occurrence of illicit drugs in two wastewater treatment plants in the South of Italy. *Chemosphere*, 198, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.158>
- Cruz, N. de la. (2015). *Estudio de la eliminación de contaminantes emergentes en aguas mediante Procesos de Oxidación Avanzados*. Repositorio institucional: [diposit.ub.edu/dspace](http://diposit.ub.edu/dspace). Retrieved from [www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)
- Da Silva, T. H., Ribeiro, A. O., Nassar, E. J., Trujillano, R., Rives, V., Vicente, M. A., ... Ciuffi, K. J. (2019). Kaolinite/TiO<sub>2</sub>/cobalt(II) tetracarboxymetallophthalocyanine nanocomposites as heterogeneous photocatalysts for decomposition of organic pollutants trimethoprim, caffeine and prometryn. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(12), 2610–2623. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190178>
- Dash, S., & Gummadi, S. (2006). Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology Letters*, 28(24), 1993–2002. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9196-2>
- Dash, S., & Gummadi, S. N. (2013). Biotechnological Approach to Caffeine Degradation: Current Trends and Perspectives. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, 1–829. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9>
- Dash, S. S., & Gummadi, S. N. (2006). Biodegradation of caffeine by *Pseudomonas* sp. NCIM 5235. *Research Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.3923/jm.2006.115.123>
- Deng, Y., & Zhao, R. (2015). Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. *Current Pollution Reports*, 1(3), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0015-z>
- dePaula, J., & Farah, A. (2019). Caffeine Consumption through Coffee: Content in the



- Beverage, Metabolism, Health Benefits and Risks. *Beverages*, 5(2), 37.  
<https://doi.org/10.3390/beverages5020037>
- Dixit, A., Mungray, A. K., & Chakraborty, M. (2012). Photochemical oxidation of phenolic wastewaters and its kinetic study. *Desalination and Water Treatment*, 40(1–6), 56–62.  
<https://doi.org/10.1080/19443994.2012.671141>
- Domènech, X., Jardim, W. F., & Litterb, M. I. (2001). Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In *Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo* (Vol. 1, pp. 3–26).
- Elhalil, A., Elmoubarki, R., Farnane, M., Machrouhi, A., Sadiq, M., Mahjoubi, F. Z., ... Barka, N. (2018). Photocatalytic degradation of caffeine as a model pharmaceutical pollutant on Mg doped ZnO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> heterostructure. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 10, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.02.002>
- Espejo, A., Aguinaco, A., García-Araya, J. F., & Beltrán, F. J. (2014). Sequential ozone advanced oxidation and biological oxidation processes to remove selected pharmaceutical contaminants from an urban wastewater. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49(9), 1015–1022.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2014.894845>
- Espejo, Azahara, Aguinaco, A., García-Araya, J. F., & Beltrán, F. J. (2014). Sequential ozone advanced oxidation and biological oxidation processes to remove selected pharmaceutical contaminants from an urban wastewater. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49(9), 1015–1022.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2014.894845>
- Geerdink, R. B., Niessen, W. M. A., & Brinkman, U. A. T. (2002). Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 970, 65–93.

- Ghaly, M. Y., Härtel, G., Mayer, R., & Haseneder, R. (2001). Photochemical oxidation of p-chlorophenol by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton process. A comparative study. *Waste Management*, 21(1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(00\)00070-2](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(00)00070-2)
- Gheraout, D., & Elboughdiri, N. (2019). Water Reuse: Emerging Contaminants Elimination—Progress and Trends. *OALib*, 06(12), 1–9. <https://doi.org/10.4236/oalib.1105981>
- Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments. *Producción + Limpia*, 7(2), 52–73. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Tushara Chaminda, G. G., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6(January), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
- Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K., & Gummadi, S. N. (2005). Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(2), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.004>
- Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K., & Gummadi, S. N. (2007). Short communication A preliminary study of caffeine degradation by *Pseudomonas* sp. GSC 1182, 113, 346–350. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.005>
- Gokulakrishnan, S., & Gummadi, S. N. (2006). Kinetics of cell growth and caffeine utilization by *Pseudomonas* sp. GSC 1182, 41, 1417–1421. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.018>
- Gummadi, S. N., Ganesh, K. B., & Santhosh, D. (2009). Enhanced degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas* sp. in agar-agar matrix using statistical approach. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2–3), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.010>

- Gummadi, S. N., & Santhosh, D. (2006). How induced cells of *Pseudomonas* sp. increase the degradation of caffeine. *Central European Journal of Biology*, 1(4), 561–571. <https://doi.org/10.2478/s11535-006-0032-4>
- Hodak, J., Quinteros, C., Litterb, M. I., & Roman, E. S. (1996). Sensitization of TiO<sub>2</sub> with phthalocyanines, 92(24), 5081–5088.
- Hoffmann, M. R., Martin, S. T., Choi, W., & Bahnemannt, D. W. (1995). Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis, 69–96. <https://doi.org/10.1021/cr00033a004>
- Ibhadon, A., & Fitzpatrick, P. (2013). Heterogeneous Photocatalysis: Recent Advances and Applications. *Catalysts*, 3(1), 189–218. <https://doi.org/10.3390/catal3010189>
- INEN. Calidad de suelo. Muestreo (2014). Ecuador: [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_iso\\_10381-2.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_10381-2.pdf). Retrieved from [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_iso\\_10381-2.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_10381-2.pdf)
- Khan, M. F., Yu, L., Achari, G., & Tay, J. H. (2019). Degradation of sulfolane in aqueous media by integrating activated sludge and advanced oxidation process. *Chemosphere*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.097>
- Khenniche, L., Favier, L., Bouzaza, A., Fourcade, F., Aissani, F., & Amrane, A. (2015). Photocatalytic degradation of bezacryl yellow in batch reactors - Feasibility of the combination of photocatalysis and a biological treatment. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 36(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.934740>
- Khudhair, D., Bhatti, A., Li, Y., Hamedani, H. A., Garmestani, H., Hodgson, P., & Nahavandi, S. (2016). Anodization parameters influencing the morphology and electrical properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes for living cell interfacing and investigations. *Materials Science and Engineering C*, 59, 1125–1142. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.042>
- Kwaśniewska-Sip, P., Cofta, G., & Nowak, P. B. (2018). Resistance of fungal growth on Scots

- pine treated with caffeine. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 132(June), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.007>
- Lambropoulou, D., Evgenidou, E., Saliverou, V., Kosma, C., & Konstantinou, I. (2017). Degradation of venlafaxine using TiO<sub>2</sub>/UV process: Kinetic studies, RSM optimization, identification of transformation products and toxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 513–526. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.074>
- Levine, I. (2004). *Fisicoquímica*. (McGraw-Hill, Ed.) (5th ed.). Madrid.
- Lin, L., Zhao, B., Chai, Y., He, B., Wei, W., He, D., & Tang, Q. (2013). Photocatalytic oxidation for degradation of VOCs. *Open Journal of Inorganic Chemistry*, 03(01), 14–25. <https://doi.org/10.4236/ojic.2013.31003>
- Lyngsø, J., Ramlau-Hansen, C. H., Bay, B., Ingerslev, H. J., Hulman, A., & Kesmodel, U. S. (2017). Association between coffee or caffeine consumption and fecundity and fertility: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Clinical Epidemiology*, 9, 699–719. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S146496>
- Marques, R. R. N., Sampaio, M. J., Carrapiço, P. M., Silva, C. G., Morales-Torres, S., Dražić, G., ... Silva, A. M. T. (2013). Photocatalytic degradation of caffeine: Developing solutions for emerging pollutants. *Catalysis Today*, 209, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.10.008>
- Mazzafera, P., Olsson, O., & Sandber, G. (1996). Degradation of Caffeine and Related Methylxanthines by *Serratia marcescens* Isolated from Soil Under Coffee Cultivation. *Microbial Ecology*, (31), 199–207. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00519-X>
- Merck, Kg. (2007). *Bactident® Oxidasa para detección de la citocromo oxidasa en microorganismos* (No. 1.13300.0001). Retrieved from [www.merck.de](http://www.merck.de)
- Mishra, N., Reddy, R., Kuila, A., Rani, A., Nawaz, A., & Pichiah, S. (2017). A Review on Advanced Oxidation Processes for Effective Water Treatment. *Current World*

- Environment*, 12(3), 469–489. <https://doi.org/10.12944/CWE.12.3.02>
- Moreira, N. F. F., Narciso-da-Rocha, C., Polo-López, M. I., Pastrana-Martínez, L. M., Faria, J. L., Manaia, C. M., ... Silva, A. M. T. (2018). Solar treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-P25 and GO-TiO<sub>2</sub> photocatalysis, photo-Fenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. *Water Research*, 135, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.064>
- Nivya, T. K., & Pieus, T. M. (2016). Comparison of Photo ElectroFenton Process(PEF) and combination of PEF Process and Membrane Bioreactor in the treatment of Landfill Leachate. *Procedia Technology*, 24, 224–231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.030>
- Nurminen, M. L., Niittynen, L., Korpela, R., & Vapaatalo, H. (1999). Coffee, caffeine and blood pressure: A critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(11), 831–839. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600899>
- Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review. *Science of the Total Environment*, 409(20), 4141–4166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.061>
- Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management*, 237(December 2018), 408–423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Poynton, H. C., & Vulpe, C. D. (2009). TERMS: toxicology; aquatic ecology; environmental indicators; DNA microarrays; ecotoxicogenomics; emerging contaminants. *Journal of the American Water Resources Association (JAWRA)*, 45(1), 83–96. <https://doi.org/10.1111>
- Ramírez-Sánchez, I. M., Martínez-Austria, P., Quiroz-Alfaro, M. A., & Bandala, E. R. (2015).

- Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Universidad de Las Américas Puebla. Revista de Tecnología y Ciencias Del Agua*, 4(5), 31–42.
- Robert, D., Keller, N., & Selli, E. (2017). Environmental photocatalysis and photochemistry for a sustainable world: a big challenge. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8935-3>
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>
- Schuh, K. J., & Griffiths, R. R. (1997). Caffeine reinforcement: The role of withdrawal. *Psychopharmacology*, 130(4), 320–326. <https://doi.org/10.1007/s002130050246>
- Scola, B., & Raoult, D. (2009). Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008041>
- Silverman, K., Evans, S., Strain, E., & Griffiths, R. (1992). Withdrawal syndrome after the double-blind cessation of caffeine consumption. *The New England Journal of Medicine*, 326(10), 653–657.
- Sornalingam, K., McDonagh, A., Zhou, J. L., Johir, M. A. H., & Ahmed, M. B. (2018). Photocatalysis of estrone in water and wastewater: Comparison between Au-TiO<sub>2</sub>nanocomposite and TiO<sub>2</sub>, and degradation by-products. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.097>
- Sun, W., Chen, J., Chen, L., Wang, J., & Zhang, Y. (2016). Coupled electron beam radiation and MBR treatment of textile wastewater containing polyvinyl alcohol. *Chemosphere*, 155, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.030>

- Tanaka, K., Hisanaga, T., & Harada, K. (1989). Efficient photocatalytic degradation of chloral hydrate in aqueous semiconductor suspension. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 48(1), 155–159. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(89\)87098-4](https://doi.org/10.1016/1010-6030(89)87098-4)
- UNESCO. (2019). Emerging Pollutants in Water and Wastewater. Retrieved from <https://en.unesco.org/emergingpollutants>
- Vaseghi, G., Haghjoo-Javanmard, S., Naderi, J., Eshraghi, A., Mahdavi, M., & Mansourian, M. (2018). Coffee consumption and risk of nonmelanoma skin cancer: A dose-response meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, 27(2), 164–170. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000322>
- Vilela, C. L. S., Bassin, J. P., & Peixoto, R. S. (2018). Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. *Environmental Pollution*, 235, 546–559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.098>
- Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., ... Lev, O. (2015a). Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas rivers. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 17(1), 41–53. <https://doi.org/10.1039/c4em00394b>
- Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., ... Lev, O. (2015b). Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas rivers. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 17(1), 41–53. <https://doi.org/10.1039/c4em00394b>
- Waghmode, T R, Kurade, M. B., Sapkal, R. T., Bhosale, C. H., Jeon, B.-H., & Govindwar, S. P. (2019). Sequential photocatalysis and biological treatment for the enhanced degradation

- of the persistent azo dye methyl red. *Journal of Hazardous Materials*, 115–122.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.004>
- Waghmode, Tatoba R., Kurade, M. B., Sapkal, R. T., Bhosale, C. H., Jeon, B. H., & Govindwar, S. P. (2019). Sequential photocatalysis and biological treatment for the enhanced degradation of the persistent azo dye methyl red. *Journal of Hazardous Materials*, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.004>
- Wang, H., Wang, C., Chen, Q., Ren, B., Guan, R., Cao, X., ... Duan, R. (2017). Interface-defect-mediated photocatalysis of mesocrystalline ZnO assembly synthesized in-situ via a template-free hydrothermal approach. *Applied Surface Science*, 412, 517–528.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.04.024>
- Wang, W. L., Wu, Q. Y., Huang, N., Xu, Z. Bin, Lee, M. Y., & Hu, H. Y. (2018). Potential risks from UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation and UV photocatalysis: A review of toxic, assimilable, and sensory-unpleasant transformation products. *Water Research*, 141, 109–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.005>
- Wang, Y., He, D., Chen, H., & Wang, D. (2019). Catalysts in electro-, photo- and photoelectrocatalytic CO<sub>2</sub> reduction reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.02.002>
- Whitehead, N., & White, H. (2013). Systematic review of randomised controlled trials of the effects of caffeine or caffeinated drinks on blood glucose concentrations and insulin sensitivity in people with diabetes mellitus. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 26(2), 111–125. <https://doi.org/10.1111/jhn.12033>
- Woolfolk, C. A. (1975). Metabolism of N methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *Journal of Bacteriology*, 123(3), 1088–1106.



- Xu, Q., Siracusa, G., Di Gregorio, S., & Yuan, Q. (2018). COD removal from biologically stabilized landfill leachate using Advanced Oxidation Processes (AOPs). *Process Safety and Environmental Protection*, 120, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.09.014>
- Xu, Q., Siracusa, G., Gregorio, S. Di, & Yuan, Q. (2018). COD removal from biologically stabilized landfill leachate using Advanced Oxidation Processes (AOPs). *Process Safety and Environmental Protection*, 120, 278–285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.09.014>
- Yahiat, S., Fourcade, F., Brosillon, S., & Amrane, A. (2011). Photocatalysis as a pre-treatment prior to a biological degradation of cyproconazole. *DES*, 281(3), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.07.042>
- Yu, C. L., Kale, Y., Gopishetty, S., Loui, T. M., & Subramanian, M. (2008). A novel caffeine dehydrogenase in *Pseudomonas* sp. strain CBB1 oxidizes caffeine to trimethyluric acid. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 772–776. <https://doi.org/10.1128/JB.01390-07>
- Yu, C. L., Loui, T. M., Summers, R. M., Kale, Y., Gopishetty, S., & Subramanian, M. (2009). Two distinct pathways for metabolism of theophylline and caffeine are coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4624–4632. <https://doi.org/10.1128/JB.00409-09>

## 4 Anexos

### Anexo No. 1. Resultados de la prueba de identificación bioquímica “Microgen GNA + B Oxidase Positive”

<b>Microgen ID</b>					
<b>Microgen GNA + B Oxidase Positive</b>					
<b>Specimen Details</b>					
Lab Ref.: MC			Date: 0:00:00		
Name: MC					
Specimen Type: Degradacion cafeina					
Source (ward/location): Suelo					
<b>Results Entry</b>					
Octal Code: 415020021					
+ OXI	Oxidase	- MOT	Motility	- NIT	Nitrate Reduction
- LYS	Lysine Decarboxylase	- ORN	Ornithine Decarboxyl	+ H2S	H2S Production
+ GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	+ XYL	Acid from Xylose
- ONP	ONPG	- IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
- VP	Voges Proskauer	+ CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Inhibition	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	+ ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	+ ARG	Arginine Dihydrolase
<b>Identification Analysis</b>					
	<i>Ps.fluorescens-25</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Ps.stutzeri</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/11.360.370	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	97,8%	2,06%	0,14%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	H2S (0,1%)	H2S (0,1%)	MOT (99,9%)	H2S (0,1%)	MOT (99,9%)
Test 2	MOT (94%)	MAL (94%)	H2S (0,1%)	GLU (0,1%)	H2S (0,1%)
Test 3	MAL (78%)	MOT (93%)	ARA (1%)	XYL (0,1%)	ARA (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth on Cetrimide	89%	94%	89%	80%	0,1%
Growth at 42C	0,1%	99,9%	0,1%	0,1%	69%
Additional Comments					
<b>Identification Comments</b>					
Acceptable Identification of Pseudomonas fluorescens 25°C					
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices					
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.					